



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ELIS ANDRADE DE LIMA ZUTIN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MODIFICAÇÕES
TOPOGRÁFICAS E QUÍMICO-ESTRUTURAIS DE SUPERFÍCIES DE
TITÂNIO NO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS E PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS**

2017

ELIS ANDRADE DE LIMA ZUTIN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MODIFICAÇÕES
TOPOGRÁFICAS E QUÍMICO-ESTRUTURAIS DE SUPERFÍCIES DE
TITÂNIO NO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS E PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Baccelli Silveira Mendonça

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Andrade de Lima Zutin, Elis

Avaliação do efeito de modificações topográficas e químico-estruturais de superfícies de titânio no potencial osteogênico de células tronco mesenquimais e pré-osteoblásticas / Elis Andrade de Lima Zutin. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.

96 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientadora: Yasmin Rodarte Carvalho

Coorientadora: Daniela Baccelli Silveira Mendonça

1. Células-tronco. 2. Implantes. 3. Nanotecnologia. 4. Titânio. 5. Osteogênese. I. Rodarte Carvalho, Yasmin, orient. II. Baccelli Silveira Mendonça, Daniela, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Gustavo Mendonça

University of Michigan

School of Dentistry

Ann Arbor - MI

Profa. Adj. Maria Aparecida Neves Jardim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. João Paulo Barros Machado

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE)

Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS)

São José dos Campos

Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 27 de novembro de 2017.

DEDICATÓRIA

À Deus,

Aos meus pais,

Ao meu marido e

À minha linda filha, Manuela

AGRADECIMENTOS

Esta é, sem dúvidas, uma das partes mais difíceis de escrever nessa tese. Por se tratar de um assunto que me emociona muito.

Sonho com esse momento há tempos. Tudo começou quando eu ainda era criança e já sabia que queria me tornar uma dentista. Assim que ingressei na faculdade, vi que eu também gostaria de ser professora. Então, tive a oportunidade de fazer pós-graduação, já sonhando com a chance de fazer um doutorado sanduíche. Depois do nascimento da Manuela, durante o mestrado, vi que as chances de se realizar esse sonho diminuiriam muito. Afinal, a Manuela havia se tornado a minha prioridade. Mas com muito apoio e incentivo da minha família, esse sonho acabou se tornando REALIDADE.

Gostaria de fazer um agradecimento especial à *Laís Morandini Carvalho*, por ter feito parte dessa etapa. A Laís também sonhava com o PDSE e também já tinha um filho. Então resolvemos nos unir e ir em busca dos nossos sonhos! Afinal: “Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só, e sonho que se sonha junto é realidade” Raul Seixas, modificado de Miguel de Cervantes.

Essa foi de longe a fase de maior aprendizado em toda minha existência. O período em que vivi tudo de uma vez só, da forma mais intensa. Que valorizei ainda mais a minha família, meus amigos, meu país e, ao mesmo tempo, o período em que aprendi o que é ser um real estudante de doutorado, descabelado, com muitas dúvidas, ideias e incertezas.

Agradeço:

Ao ICT-UNESP e a toda equipe de funcionários pelo apoio, profissionalismo e convívio por tantos anos.

À coordenação, professores, técnicos e funcionários do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal e do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, pela grande

oportunidade de tamanho crescimento profissional e pessoal, que levarei para o resto de minha vida.

Ao Centro de Convivência Infantil (CCI) por ter cuidado com muito amor e por tanto tempo da minha pequena Manuela, mesmo depois que retornamos do PDSE.

Ao meu querido professor *Leonardo Marchini*, por ter sido um grande exemplo tão cedo na minha vida profissional. Por ter me mostrado da melhor forma possível, o caminho da vida acadêmica ainda na Iniciação Científica e por todo aprendizado adquirido ao longo desses anos.

Ao querido professor *Antonio Olavo Cardoso Jorge* pelas palavras de incentivo, carinho e preocupação. Pela grande oportunidade de ter sido sua orientada durante um curto período, mas muito intenso no Mestrado. Pessoas como o senhor não deveriam poder se aposentar, professor! Sinto muitas saudades das nossas conversas.

À minha querida orientadora e professora *Yasmin Rodarte Carvalho*, por me receber de braços abertos no Doutorado. Por ter me dado a chance de conviver com um grande exemplo de mulher e profissional extremamente dedicada. Pela sua disponibilidade e por estar sempre ao lado de seus alunos para enfrentar todas as situações! Sou muito grata por ter tido a oportunidade de conviver e aprender tanto com a senhora, professora. Em todos os sentidos.

À professora Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos por sua colaboração essencial no desenvolvimento dessa pesquisa. Por sua participação no delineamento de projetos relacionados, pela indicação das melhores parcerias para a execução do trabalho e por sua praticidade em ajudar a resolver as intercorrências que surgiram no decorrer do caminho. Muito obrigada, Luana!

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa nacional e internacional (PDSE), para a realização do Doutorado.

Aos queridos professores *Gustavo Mendonça* e *Daniela Baccelli Silveira Mendonça* pela oportunidade de viver a experiência mais incrível de toda a minha vida. Pela confiança e por todo conhecimento compartilhado. Pelo grande exemplo de profissionais batalhadores. Pela preocupação com o nosso bem-estar, com o bem-estar das crianças e de nossos familiares.

Jamais esquecerei tudo que aprendi e tudo que vocês fizeram por nós. Espero poder continuar aprendendo muito com vocês!

À Universidade de Michigan, Dental School e North Campus Complex Research (NCRC).

À querida amiga *Elisa Mattias Sartori*, pelos bons e não tão bons momentos que passamos juntas. Por todo o conhecimento e aprendizado compartilhado. Por ter suavizado meu caminho em Ann Arbor. Pela parceria no laboratório, principalmente na reta final de execução desse trabalho. Por me atualizar sobre as músicas mais tocadas no Brasil, rs! Por tantos passeios agradáveis e momentos de reflexão. Sinto muitas saudades de você, Elisa!

Ao professor *Paul Krebsbach* por me receber como aluna visitante e proporcionar a infraestrutura necessária para a realização de pesquisa de alto nível, na Universidade de Michigan. Obrigada também, pelos momentos de “happy hour”.

Ao *Krebsbach Lab* por compartilhar o espaço físico, pela hospitalidade e amizade durante o PDSE. Vou levá-los sempre no meu coração: *Jin Koo, Joe, Tugba, Luiz, Connor, Halima, Fatima, Alexandra*.

Ao North Campus Children’s Center (NCCC) e às professoras *Jillian, Chris, Stacia e Alessandra* pelo cuidado, paciência e ensinamentos. Pelos amigos que fizemos durante o período em que a Manuela frequentou a escola.

Ao professor *João Paulo Barros Machado*, por sua competência, ideias e por proporcionar a infraestrutura do INPE para enriquecer esse trabalho. Por sua disponibilidade e paciência em compartilhar seu conhecimento. Obrigada também ao *Sr. Sócrates* (pai do João Paulo), pelos cafés e risadas nos intervalos de experimentos no INPE.

À Dra. *Fábia Zampieri Dantola* por sua imensa prestatividade e grande ajuda com a análise da molhabilidade incluída nessa tese.

Aos meus colegas de pós-graduação, pelo compartilhamento de experiências, por tantos momentos de risadas e descontração. Às minhas queridas amigas e confidentes *Noala Vicensoto*

Moreira Milhan e Patrícia Pimentel de Barros pela parceria na vida acadêmica e pessoal. Obrigada meninas!

Ao professor Prof *Ivan Balducci*, pela grande ajuda com as análises estatísticas desse trabalho. Pelos bons conselhos e pelos cafés. Muito obrigada, professor!

À professora *Monica Fernandes Gomes*, pelas palavras de reconhecimento e incentivo. Obrigada pelo carinho, professora!

À *Cláudia Oliveira Morandini* (terceira avó da Manuela e mãe da Laís) por ter cuidado com todo amor e carinho da Manuela logo nos primeiros minutos em que elas se conheceram, rs! Por ter me dado forças para me manter em pé em um dos momentos mais difíceis de minha vida, quando minha sobrinha (Beatriz) esteve na UTI. Pelas cervejas e muitas risadas de nós mesmas!

À *Ana Carolina Cardoso Morandini (Carol)* por ter deixado sua família e afazeres no Brasil para ir nos ajudar em Ann Arbor. Pela sua companhia e bons conselhos. Por ter cuidado da Manuela com todo amor. Obrigada, Carol!

À minha querida sogra e segunda mãe *Maria Helena Zutin Gonçalves*, pelo apoio de sempre! Não somente em Ann Arbor, mas por tudo o que a senhora significa para mim e para a Manuela. Poucas pessoas tem a sorte de ter uma sogra maravilhosa como eu tenho. Uma segunda mãe. Obrigada por tudo!

Ao meu sogro *Leocrádio Gonçalves*, por também ser como um pai para mim. Busco palavras para expressar o que vocês significam na minha vida. Obrigada pelas palavras de apoio e incentivo.

Aos meus amados pais, por quem eu tenho muita admiração. Por me ensinarem a lutar pelos meus sonhos. Por me amarem e amarem a minha filha incondicionalmente. Por serem meus pais. Agradeço à Deus por essa generosidade. Tudo que eu sou, devo aos meus pais. Meus amados pais. Minha grande fonte de bons exemplos. Obrigada por tudo!

Às minhas irmãs *Tatiana* e *Simone*, por me apoiarem e incentivarem. Por tantos bons momentos vividos, principalmente agora com as nossas pequenas juntas (Manuela, Cecília e Beatriz)! Não existe maior riqueza do que essa. Obrigada, meninas! Amo vocês.

Ao meu marido *Renato Zutin Gonçalves*, por me acompanhar, apoiar e me incentivar nessa longa trajetória. Por ser um grande pai para a nossa filha. Por ter me apoiado e permitido que eu levasse a Manuela comigo para Ann Arbor. Também tenho muita sorte por ter um marido como você, que faz tudo se tornar menos difícil para nós. Obrigada meu amor!

A minha querida tia *Maria Aurinete Andrade Lopes* por ter vindo do Ceará para ficar com a Beatriz para os meus pais poderem ir para Ann Arbor. A senhora faz parte da nossa família, tia. Desde sempre. Muito obrigada!

Aos amigos coreanos, *Sang-ah* e *Edwin Kyuwook Leon* pela convivência, amizade e prestatividade. Por me mostrarem que uma verdadeira amizade pode ser conquistada em qualquer lugar do mundo! Espero ansiosamente pelo nosso próximo encontro. Jamais esquecerei o que vocês fizeram por nós.

Aos amigos poloneses, *Malgorzata Winska* e *Arkadiusz Winski* por tantos momentos de descontração, principalmente pelos nossos churrascos. Vocês fizeram com que eu me sentisse “no Brasil” novamente. Saudades de vocês!

Às professoras de inglês *Christine*, *Greetchen* e *Libby Garno*, por voluntariamente ensinarem a língua inglesa. Foi um privilégio aprender com vocês, sinto muita falta do nosso convívio.

Aos meus amigos, todos eles. Tive a sorte de encontrar pessoas especiais ainda muito presentes na minha vida, logo na minha infância. Obrigada por torcerem e me darem tanta força! Por me fazerem rir mesmo nos momentos mais difíceis. Prometo que daqui para frente terei mais tempo para vocês, rs! Prometo também que vou voltar a ser “normal”, certo Hui?!

À minha filha Manuela. Por me fazer ver o real sentido da vida. Obrigada meu amor, pela parceria e força nos momentos mais difíceis das nossas vidas. Te amo!

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
“É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações”

Trem Bala (Ana Vilela)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE QUADROS	15
LISTA DE TABELAS	16
RESUMO	18
ABSTRACT.....	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 PROPOSIÇÃO	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Preparo dos discos de titânio	28
3.2 Caracterização das superfícies.....	30
3.2.1 Difração de raios X (DRX).....	30
3.2.2 Goniômetro.....	30
3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	31
3.2.4 Perfilometria óptica.....	31
3.2.5 Microscopia de força atômica (MFA).....	32
3.3 Cultura de células	32
3.4 MEV com células.....	35
3.5 Atividade da fosfatase alcalina (ALP).....	36
3.6 Unidades formadoras de colônias de osteoblastos por meio da atividade da fosfatase alcalina (UFC-Ob).....	37
3.7 Análise de mineralização (deposição de cálcio)	38
3.8 Ensaio bioluminescente de luciferase com plasmídeo do gene <i>Col 5a3</i>	39
3.9 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR).....	41
3.9.1 Extração do RNA das células sobre os discos	41
3.9.2 Síntese de cDNA	41
3.9.3 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR).....	42
3.10 Análise estatística	42
4 RESULTADO	44
4.1 Difração de raios X (DRX).....	44
4.2 Goniômetro.....	47

4.3	Análise das superfícies por microscopia eletrônica de varredura (MEV) ...	49
4.4	Perfilometria óptica.....	53
4.5	Microscopia de força atômica (MFA).....	57
4.6	MEV com células.....	59
4.7	Atividade da fosfatase alcalina (ALP).....	60
4.8	Unidades formadoras de colônias de osteoblastos por meio da atividade da fosfatase alcalina (UFC-Ob).....	67
4.9	Análise de mineralização (deposição de cálcio)	68
4.10	Ensaio bioluminescente de luciferase com plasmídeo do gene <i>Col5a3</i> .	73
4.11	Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)	74
5	DISCUSSÃO	77
6	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Discos submersos em soluções preparadas para criar topografias de superfície em micro e em nanoescala, respectivamente	29
Figura 2 - Forma de obtenção das CTMc para cultivo primário.....	38
Figura 3 - Difractometria de raios X da amostra com superfície lisa. Determinaram-se picos de raios X característicos da fase α do titânio	45
Figura 4 - Difractometria de raios X da amostra de TiCP com topografia em microescala. Determinaram-se picos de raios X característicos das fases α - titânio, rutilo, anatase e TiH_2	46
Figura 5- Difractometria de raios X da amostra de TiCP com topografia em nanoescala. Determinaram-se picos de raios X característicos das fases α , rutilo e anatase do titânio	47
Figura 6 – Imagens de gotas de água sobre as superfícies das amostras no teste do goniômetro.....	48
Figura 7 – Gráfico representativo das médias dos AC, obtidas no teste do goniômetro, para as superfícies estudadas	49
Figura 8 - Superfície com topografia lisa	50
Figura 9 - Superfície com topografia em microescala	51
Figura 10 - Superfície com topografia em microescala	51
Figura 11 - Superfície com topografia em nanoescala	52

Figura 12 - Superfície com topografia em nanoescala	53
Figura 13 – Gráficos representativos dos números médios obtidos para a Ra (μm) e para a Aa (mm^2) das amostras com diferentes topografias de superfície	54
Figura 14- Micrografia em perfilômetro óptico da amostra lisa	55
Figura 15 - Micrografia em perfilômetro óptico da amostra com topografia em microescala	56
Figura 16 - Micrografia em perfilômetro óptico da amostra com topografia em nanoescala	57
Figura 17 – Microscopia de força atômica da amostra com topografia de superfície lisa com área de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$	58
Figura 18 - Microscopia de força atômica da amostra com topografia de superfície em microescala com área de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$	58
Figura 19 – Microscopia de força atômica da amostra com topografia de superfície em nanoescala com área de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$	59
Figura 20 - Células sobre a superfície com topografia em microescala	60
Figura 21 - Células sobre a superfície com topografia em nanoescala	60
Figura 22 – Gráfico representativo da atividade de ALP em CTMh sob o meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias	62
Figura 23 - Gráfico representativo da atividade de ALP em CTMh sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias.....	63

Figura 24 - Gráfico representativo de ALP em células MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio Ost.2, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias	65
Figura 25 - Gráfico representativo da atividade de ALP em células MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias	66
Figura 26 – Gráfico representativo do número médio de UFC-Ob em CTMc sobre as superfícies estudadas e no grupo controle, após 14 dias	68
Figura 27 - Gráfico representativo da deposição de cálcio em CTMh sob o meio osteogênico 1 nas diferentes topografias de superfície, após 14 e 28 dias	69
Figura 28 - Gráfico representativo da deposição de cálcio em células MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias	71
Figura 29 - Gráfico representativo da deposição de cálcio em células MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias	72
Figura 30 – Gráfico representativo da atividade relativa da luciferase relacionada ao <i>Col 5a3</i> em células MC3T3-E1 subclone 14 sob os meios regular e Ost.2 nas diferentes topografias de superfície, após 48 horas	74
Figura 31- Gráficos representativos da expressão dos genes <i>Runx2</i> , <i>Satb2</i> , <i>Sp7</i> , <i>Prrx1</i> , <i>Alp</i> , <i>Bmp2</i> e <i>Ibsp</i> em MC3T3E1 subclone 42, sob meio Ost.2, após 7 dias ..	75
Figura 32 - Gráficos representativos da expressão dos genes <i>Runx2</i> , <i>Satb2</i> , <i>Sp7</i> , <i>Prrx1</i> , <i>Alp</i> , <i>Bmp2</i> e <i>Ibsp</i> em MC3T3E1 subclone 42, em meio regular, após 7 dias	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tipos de tratamentos de superfícies realizados nas amostras estudadas.....	29
Quadro 2 - MEM- α e os suplementos utilizados.....	33
Quadro 3 - DMEM F12 e os suplementos utilizados	34
Quadro 4 - Ensaio e respectivo período de realização, de acordo com os meios de cultura, tipo e quantidade de células utilizadas. Para todos os ensaios utilizou-se n=3 para cada superfície	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de média e desvio padrão, dos dados de AC obtidos no teste goniômetro, sobre as superfícies das amostras estudadas.....	48
Tabela 2 - Valores obtidos por perfilometria óptica das amostras estudadas	54
Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em CTMh sob meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície aos 3, 7 e 14 dias	61
Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em CTMh sob meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias	63
Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em MC3T3-E1 subclone 42 sob meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias	64
Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias	66
Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão obtidos para UFC-Ob em CTMc sob meio regular, aos 14 dias	67
Tabela 8 - Valores médios e desvio padrão obtidos em O.D da deposição de cálcio em CTMh sob meio osteogênico 1, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias	69
Tabela 9 – Valores médios e desvio padrão (DV) obtidos em O.D da deposição de cálcio em MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias	70

Tabela 10 - Valores médios e desvio padrão (DV) obtidos em O.D da deposição de cálcio em MC3T3-E1 subclone 42, sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias..... 72

Tabela 11 - Valores médios e desvio padrão (DV) obtidos em u.a da expressão do *Col5a3* em MC3T3-E1 subclone 14, sob os meios regular e Ost.2, nas diferentes topografias de superfície, após 48 horas..... 73

Zutin EAL. Avaliação do efeito de modificações topográficas e químico-estruturais de superfícies de titânio no potencial osteogênico de células tronco mesenquimais e pré-osteoblásticas [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

Os efeitos de modificações topográficas e químico-estruturais em superfícies de implantes e sua relação com o comportamento celular na interface com o biomaterial, não foram totalmente elucidados. Avaliou-se o efeito de modificações na topografia, composição química e estrutura cristalina de superfícies de titânio comercialmente puro (TiCP) grau IV sobre o potencial osteogênico de células-tronco mesenquimais humanas (CTMh), de células-tronco mesenquimais de camundongo (CTMc) e de células pré-osteoblásticas murinas (MC3T3E1), em diferentes meios de cultivo celular. Amostras de TiCP com superfície lisa e com topografia rugosa em micro e nanoescala foram criadas e caracterizadas por difratometria de raios-X (DFX), goniômetro; microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfilômetro óptico (PO) e microscopia de força atômica (MFA). Realizaram-se ensaios osteogênicos de atividade da fosfatase alcalina (ALP); de formação de colônias de osteoblastos (UFC-Ob); de mineralização; de atividade da luciferase (colágeno) e de expressão gênica (qPCR). Para todas as análises estatísticas o nível de significância foi de 5%. Fases cristalinas do TiCP como Ti α , rutilo e anatase, foram identificadas por DFX; o goniômetro comprovou a hidrofobicidade das superfícies; as superfícies rugosas apresentaram valores de rugosidade média (Ra), obtidos por PO maiores do que a superfície lisa ($p < 0,0001$); características micro e nanoestruturais foram comprovadas, medidas e analisadas por MEV e por MFA. A superfície nanotexturizada apresentou maior potencial osteogênico independente do tipo celular e/ou meio de cultivo utilizados nos ensaios de mineralização ($p < 0,05$) e qPCR. Nos ensaios de atividade de ALP em CTMh sob meio osteogênico ($p = 0,001$) e expressão de colágeno em meio regular, também observou-se maior potencial osteogênico da superfície nanotexturizada. A superfície microtexturizada apresentou maior atividade de ALP em CTMh sob meio regular ($p = 0,006$) e em MC3T3E1 sob meio osteogênico 2 ($p = 0,01$); maior produção de colágeno sob meio osteogênico 2 e maior número de UFC-Ob em CTMc em meio regular ($p = 0,004$). Concluiu-se que a diferenciação osteogênica é influenciada tanto pelos efeitos sinérgicos dos tratamentos empregados para a criação de superfícies micro e nanotexturizadas, quanto pelo tipo celular e meios de cultivo utilizados nos testes biológicos. A superfície nanotexturizada apresentou maior potencial de induzir mineralização e expressão de genes osteogênicos *in vitro*.

Palavras-chave: Células-tronco. Implantes. Nanotecnologia. Titânio. Teste de materiais. Osteogênese.

Zutin EAL. *The effect of topographic and chemical-structural modifications of titanium surfaces on the osteogenic potential of mesenchymal stem cells and pre-osteoblastic cells [doctorate thesis].* São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

ABSTRACT

The effects of topography and chemical modifications on implants surfaces and its relation with the cellular behavior at the interface with the biomaterial, are not fully elucidated. The effect of changes in the topography, chemical composition and surface crystalline structure of commercially pure titanium (TiCP) grade IV on the osteogenic potential of human mesenchymal stem cells (hMSCs), mouse mesenchymal stem cells (mMSCs) and pre-osteoblastic cells (MC3T3E1), in different cell culture media were evaluated. Smooth surfaces and rough topography in micro and nanoscale were created and characterized by X-ray diffraction (XRD), wettability, scanning electron microscopy (SEM), light interferometry (IFM), atomic force microscopy (AFM). Osteogenic assays of alkaline phosphatase activity (ALP), of osteoblast colonies formation (CFU-Ob); mineralization; luciferase activity (collagen) and gene expression (qPCR) were performed. For all statistical analyzes the level of significance was set to 5%. Crystalline TiCP phases such as Ti α , rutile and anatase were identified by XRD; the goniometer confirmed hydrophilicity of all surfaces; the rough surfaces presented mean of Ra roughness parameter obtained by IFL greater than the smooth surface ($p < 0.0001$); micro and nanofeatures were verified, measured and analyzed by MEV and MFA. Nanotexturized surface presented higher osteogenic potential independent of the cell type or culture media used in the mineralization ($p < 0,05$) and qPCR assays. A greater osteogenic potential of the nanotexturized surface was also observed for ALP activity in hMSCs under osteogenic medium ($p=0,001$) and expression of collagen in regular medium assays. The microtexturized surface presented higher ALP activity in hMSCs under regular media ($p = 0.006$) and in MC3T3E1 cells under osteogenic media 2 ($p=0.01$); higher collagen production under osteogenic medium 2 and higher CFU-Ob number in mMSCs in regular media ($p=0,004$). It was concluded that osteogenic differentiation is influenced both by the synergistic effects of the treatments used to create micro- and nanotexturized surfaces, and by the cell type and culture media used in biological tests. The nanotexturized surface presented greater potential in vitro to induce mineralization and osteogenic genes expression.

Keywords: Stem cells. Implants. Nanotechnology. Titanium. Materials testing. Osteogenesis.

1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais são definidos como materiais naturais ou sintéticos utilizados para substituir tecidos biológicos perdidos para restaurar a forma e função (Geetha et al., 2009; Bhat, Kumar, 2013). Apresentam propriedades adequadas que os tornam capazes de entrar em contato direto com um tecido vivo sem causar qualquer reação imune adversa ou rejeição. Uma de suas principais características é não necessitar do metabolismo do tecido vivo para realizar suas funções (Minagar et al., 2012).

A bioengenharia, nanotecnologia e engenharia tecidual têm desenvolvido biomateriais para aplicação na área da saúde, no combate e tratamento de doenças, desde o início do século XX. Estudos para utilização de biomateriais em reabilitações protéticas para substituição de tecido ósseo perdido, tanto na área médica quanto na odontológica, têm sido realizados de maneira crescente e contínua, devido ao envelhecimento da população que apresenta maior risco para perda de tecidos duros e doenças articulares degenerativas (Geetha et al., 2009; Kulkarni et al., 2015). Com isso, o número de re-intervenções cirúrgicas que são extremamente onerosas para os planos de saúde, também aumenta. Essas re-intervenções requerem longos períodos de cirurgia, cuidados pós-operatórios e estão relacionadas a altas taxas de morbidade (Variola et al., 2011).

Há, ainda, um alto índice de falhas no processo de formação óssea que envolve a osseointegração, principalmente em pacientes imunocomprometidos, fumantes e com pobre qualidade óssea (Mendonça G et al., 2010; Chen H et al., 2013). Traumas cirúrgicos associados com cicatrização deficiente, sobrecarga e infecções também estão relacionados à perda de implantes (Duyck, Vandamme, 2014; Lorenzetti et al., 2014).

No entanto, um crescimento muito elevado na fabricação de implantes é esperado nos próximos anos e essa alta demanda, torna imperativos esforços no desenvolvimento de biomateriais com alta longevidade e excelente biocompatibilidade (Mendonça G et al., 2008; Niinomi et al., 2012; Bhat, Kumar, 2013).

O titânio e suas ligas é o biomaterial mais utilizado para esses tipos de reabilitação, devido às suas adequadas propriedades mecânicas como módulo de elasticidade, ductilidade, resistência à tração, ao desgaste e boa razão entre

resistência mecânica e peso. Propriedades químicas como a resistência à corrosão, a biocompatibilidade e a capacidade de harmonizar-se com outros materiais, também o colocam como biomaterial de primeira escolha para reabilitações a longo prazo em próteses ortopédicas e dentárias (Mendonça G et al., 2008; Geetha et al., 2009; Variola et al., 2011; Niinomi et al., 2012; Guo Y et al., 2013; Gaviria et al., 2014; El-Hajje et al., 2014).

O titânio é um elemento que pode exibir mais de uma forma cristalográfica (polimorfismo), possibilitando o desenvolvimento de novas ligas. As ligas de titânio podem ser do tipo α (alfa), $\alpha + \beta$ (beta) e β . A estrutura cristalina do titânio na fase α é de um hexágono compacto (hc), isso ocorre em temperaturas inferiores ou iguais a 882,5°C. A estrutura do cristal na fase β é cúbica de corpo centrado (ccc), e isso ocorre quando o titânio é submetido a temperaturas superiores a 882,5°C. A temperatura de transformação da fase α para β aumenta ou diminui de acordo com a natureza dos elementos químicos da liga, que tendem a estabilizar as fases α ou β do titânio (Geetha et al., 2009; Niinomi et al., 2012).

Uma fina camada protetora de óxido, principalmente composta por TiO_2 , recobre espontaneamente os implantes de titânio quando entram em contato com o ar e/ou fluidos biológicos. A morfologia e a estabilidade dessa camada apresentam importante papel na osseointegração e na biocompatibilidade, por interferirem na adesão, proliferação e diferenciação celulares (Zhu X et al., 2004; Gaintantzopoulou et al., 2014). Os efeitos biológicos da composição química da superfície são relacionados principalmente a arquitetura da camada de TiO_2 (Ehrenfest et al., 2010).

O TiO_2 ocorre na natureza em três formas cristalinas polimórficas: anatase, broquita e rutilo. A anatase tem sido bastante investigada por sua capacidade fotocatalítica, hidrofiliabilidade e descontaminação biológica (Lorenzetti et al., 2014).

Estudos que visam melhorar a resposta celular e o índice de sucesso de osseointegração dos implantes têm sido direcionados à topografia e à composição da superfície do material, com o objetivo de modificar as propriedades físico-químicas, mecânicas e elétricas dos mesmos (Zhu X et al., 2004; Mendonça G et al., 2008; Bhat, Kumar, 2013; Matassi et al., 2013; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2013; Bruinink et al., 2014; Chen WC et al., 2014; Rath et al., 2014; Andrade et al., 2015).

A nanotecnologia e a engenharia tecidual associada ao uso das células-tronco, podem melhorar e facilitar os tratamentos já existentes, pois podem

incrementar a bioatividade e a integração dos implantes (Mendonça G et al., 2008; Bhat, Kumar, 2013; Bruinink et al., 2014; Chen WC et al., 2014; Rath et al., 2014; Chan et al., 2015).

A texturização da superfície do biomaterial é utilizada para melhorar seu imbricamento mecânico com o tecido ósseo. O jateamento com Al_2O_3 (alumina) é um tipo de texturização caracterizado pela deposição de micropartículas na superfície do biomaterial, que é comumente seguido por condicionamento ácido e, dessa forma são criadas rugosidades com ranhuras irregulares na superfície (Ehrenfest et al., 2010; Rüger et al., 2010; Zhuang et al., 2014).

Utiliza-se também deposição de nanopartículas, de feixe de íons, de hidroxiapatita, auto-montagem de monocamadas, tratamento alcalino, anodização, entre outros (Mendonça G et al., 2008; Oliveira et al., 2013; Saita et al., 2016; Kulkarni et al., 2016). Estes métodos promovem um ambiente semelhante ao natural, facilitando os processos de osteoindução e osteocondução (Albrektsson, Johansson, 2001; Mendonça G et al., 2008; Mendonça DB et al., 2011).

Dentre os métodos utilizados para criar a topografia em micro e nanoescala o condicionamento ácido e a peroxidação são amplamente empregados (Ehrenfest et al., 2010; Mendonça G et al., 2008). Ácidos como o fluorídrico (HF), clorídrico (HCl), nítrico (HNO_3), e sulfúrico (H_2SO_4) podem ser combinados e/ou utilizados em conjunto com peróxidos (Variola et al., 2011; Jemat et al., 2015).

A combinação do H_2SO_4 com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (solução piranha) para criar topografia em nanoescala é um método fácil e acessível que modifica a superfície física e quimicamente, aumenta sua rugosidade e espessura de TiO_2 , melhora a adesão celular, a formação óssea e diminui a quantidade de contaminantes sobre a superfície (Nanci et al., 1998; Vetrone et al., 2009; Bueno et al., 2011; Variola et al., 2011; Freitas et al., 2016).

Avaliar características básicas das superfícies como sua topografia, composição química e estrutural permite relacioná-las com o comportamento celular na interface com o biomaterial, dados muitas vezes omitidos por interesse comercial de empresas (Ehrenfest et al., 2010).

A interação das células sobre a superfície dos implantes é iniciada pela fase de adesão que ocorre principalmente pela força de van der Waals (Minagar et al., 2012; Gaviria et al., 2014). Proteínas receptoras específicas como as integrinas e as

caderinas são extremamente importantes para a adesão das células na superfície do biomaterial, que adsorve água e proteínas dos fluidos biológicos antes de entrar em contato com as células (Anselme, 2000; Mendonça G et al., 2008).

As integrinas são heterodímeros transmembranosos que podem levar informações para o interior das células relacionadas à adesão, espalhamento ou migração, regulando o crescimento e a diferenciação celulares, pois agem na interface entre os compartimentos intra e extra-celulares e entre o substrato e as células. As caderinas são glicoproteínas transmembranosas relacionadas à adesão entre as células, atuam com outros parceiros intracelulares como as cateninas que interagem com proteínas intranucleares (Anselme, 2000).

A expressão coordenada de diversas moléculas incluindo os fatores de crescimento e de transcrição, induz estímulos celulares e moleculares para orientar a diferenciação celular na osteogênese (Albrektsson, Johansson, 2001). Dentre os mais importantes temos os fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs), transformador- β (TGF- β), semelhante à insulina (IGFs), derivado de plaquetas (PDGF), as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), as citocinas (IL-1 e IL-6) e os fatores de transcrição Runx-2 e osterix (Oryan et al., 2015).

Os fatores de crescimento iniciam a cascata de sinalização por meio da adesão a receptores específicos na membrana celular, levando à transdução do sinal dentro do núcleo celular, onde os fatores de transcrição são ativados, afetando a expressão gênica que influencia funções importantes como a divisão celular, síntese de matriz e diferenciação tecidual. (Oryan et al., 2015).

Os fatores de transcrição como Runx-2 e osterix são essenciais para a diferenciação de osteoblastos e formação óssea, sendo que o Runx-2 é importante no desenvolvimento pré-osteoblástico, pois ativa genes específicos de osteoblastos como a osteopontina, colágeno do tipo 1, osteocalcina e a fosfatase alcalina (Wittkowske et al., 2016). O osterix ativa genes durante a maturação de osteoblastos e osteócitos, é expresso em osteoblastos adultos e apresenta função importante na homeostase óssea (Sinha, Zhou, 2013).

A matriz extracelular também interfere no processo de reparo ao redor dos implantes, pois apresenta um importante papel na interface da superfície do biomaterial com o tecido ósseo, e é sintetizada e degradada por células. Consiste em 90% de proteínas colágenas (colágeno do tipo I e V) e 10% de proteínas não

colágenas (osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fibronectina, fatores de crescimento, proteínas ósseas morfogenéticas, sialoproteína, entre outras) (Schindeler et al., 2008; Minagar et al., 2012; Oryan et al., 2015).

As propriedades físico-químicas do tecido ósseo neoformado e as moléculas que fazem parte da formação da matriz extracelular, são determinantes na biomecânica dos implantes endósseos (Ferreira et al., 2012). Mendonça DB et al. (2011) observaram em discos de titânio com superfície rugosa, uma modulação positiva da biossíntese do colágeno em células mesenquimais humanas diferenciadas em osteoblastos, quando comparados com discos de titânio de superfície lisa.

Hakki et al. (2012) avaliaram a expressão de genes de formação óssea como as BMPs 2 e 6, osteocalcina, osteopontina, fosfatase alcalina, colágeno do tipo I e de genes de reabsorção óssea como as metaloproteinases de matriz 2 e 9, relacionadas à degradação do colágeno do tipo IV, em superfícies de implantes com menor e com maior rugosidade e na superfície de implantes polidos. Esses autores observaram que a expressão de todos os genes aumentou conforme o aumento da rugosidade do implante, mostrando que a rugosidade nas superfícies dos implantes tem um efeito significativo sobre o comportamento celular.

Células-tronco mesenquimais (CTM) e células osteogênicas podem ser utilizadas para estudos de interação entre a célula e a superfície de amostras de implantes de titânio, por meio da análise de indicadores de osteogênese e da avaliação da biocompatibilidade (Bouillaguet et al., 2004; Balmayor, 2015). Adequados modelos celulares que possam responder a estímulos mecânicos semelhantes aos encontrados *in vivo*, nas células, são de extrema importância para avanços em pesquisas de engenharia tecidual óssea (Wittkowske et al., 2016). Esse ambiente complexo, que imita a matriz extracelular do tecido ósseo, pode ser encontrado em culturas primárias de osteoblastos e em clones de linhagem murina de precursores de osteoblastos como MC3T3-E1 (Wang et al., 1999). Adicionalmente, as células MC3T3-E1 subclone 42 contêm cópias transfectadas estáveis do promotor do gene da osteocalcina, controlando o gene repórter da luciferase *firefly* (Wang et al., 1999; Xiao et al., 2002).

Testes bioquímicos como o de mensuração da quantidade de matriz mineralizada, proteína total e fosfatase alcalina, são utilizados para ensaio da osteogênese. A presença de nódulos de mineralização em meio osteogênico

comprova a diferenciação e funcionalidade dos osteoblastos (Hoemann et al., 2009); a quantidade de proteínas totais produzidas pelos osteoblastos aumenta proporcionalmente com o número de células ósseas e a fosfatase alcalina é uma enzima que marca a formação óssea e apresenta importante papel na mineralização (Beloti, Rosa, 2005).

Poucos estudos avaliam a modulação do meio de cultivo celular sobre os efeitos da superfície em nanoescala na diferenciação de CTM. Com isso, há a importância de se elucidar os efeitos isolados da topografia em nanoescala na diferenciação osteogênica, antes de avaliar os efeitos combinados da topografia em nanoescala com os suplementos osteogênicos utilizados nos meios de cultivo celular (Dobbenga et al., 2016).

A topografia de superfície apresenta papel chave na diferenciação de células mesenquimais osteoprogenitoras em osteoblastos e, acelera o processo de osseointegração (Mendonça G et al., 2008; Ehrenfest et al., 2010; Dobbenga et al., 2016).

Baseado no que foi exposto, o presente estudo teve por objetivo principal avaliar o potencial osteogênico de células-tronco mesenquimais e de pré-osteoblásticas, em contato com amostras de TiCP grau IV, em superfícies lisas e com rugosidades em micro e nanoescala, para potencial aplicação biomédica. Para possibilitar o entendimento da interação entre as células e a superfície das amostras, as mesmas foram caracterizadas de acordo com sua topografia, composição química e estrutura cristalina.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito de modificações na topografia, composição química e estrutura cristalina de superfícies de titânio, no potencial de diferenciação osteogênico de células-tronco mesenquimais humanas, de camundongos e pré-osteoblásticas murinas, por meio de ensaios osteogênicos com diferentes meios de cultivo celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar o efeito das modificações de superfícies de titânio, foram adquiridos discos de titânio comercialmente puro (TiCP grau IV) medindo 20,0 mm x 1,0 mm (VULCANIUM Metals International, Northbrook, IL, USA).

Para caracterização das superfícies das amostras utilizaram-se as análises de difratometria de raios-X, goniômetro, microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfilômetro óptico e microscopia de força atômica (MFA).

Para analisar a atividade osteogênica, foram realizados testes de atividade da fosfatase alcalina (ALP), de mineralização (deposição de cálcio), ensaio bioluminescente de luciferase (colágeno) e qPCR para análise da expressão de genes osteogênicos (*Runx2*, *Satb2*, *Sp7*, *Prrx1*, *Alp*, *Bmp2* e *Ibsp*). Utilizaram-se células tronco mesenquimais e diferentes subclones de pré-osteoblastos (14 e 42) em contato com superfícies de TiCP grau IV lisas e com rugosidades em micro ou nanoescala.

3.1 Preparo dos discos de titânio

O preparo das amostras foi baseado em estudos anteriores de (Mendonça G et al., 2010; Mendonça DB et al., 2011).

Discos de TiCP grau IV (20,0 mm x 1,0 mm) com a superfície lisa foram usados como controle e passaram apenas por processo de polimento com lixa de granulação 600. Nos demais grupos, os discos foram submetidos a lixas abrasivas e de polimento, com granulação de 320, 400 e 600. Após o polimento, estes foram jateados com partículas de 100 µm de alumina (Al₂O₃), com ângulo de incidência de 90°. Posteriormente, todos os discos foram lavados 3 vezes por 15 minutos, com água destilada em cuba ultrassônica.

Para criação da microtopografia, os discos foram imersos em solução de ácido sulfúrico (2N H₂SO₄) e para a criação da nanotopografia, foram imersos em solução de 2N H₂SO₄ e 30% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na proporção de 1:1, ambos

por 12 horas (Figura 1). Após isso, os discos foram novamente lavados 3 vezes por 15 minutos, com água destilada em cuba ultrassônica.

Em seguida, todos os discos foram submetidos à esterilização através de imersão em álcool 70% por 15 minutos e após a remoção do álcool foram deixados na luz ultravioleta, até a completa secagem sob o fluxo laminar.

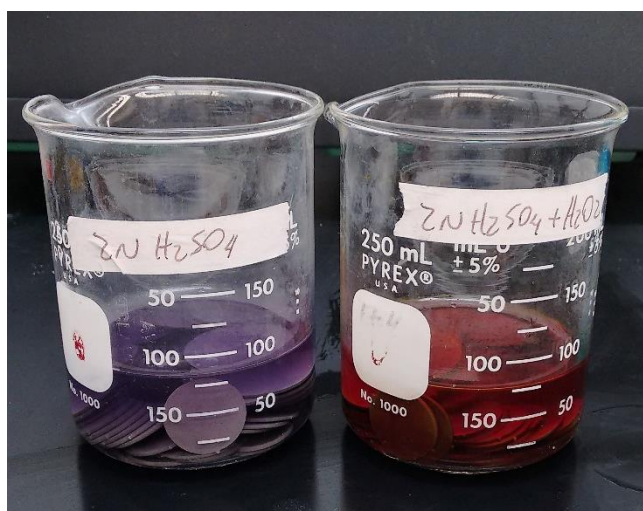
Para reutilização, antes do jateamento e dos tratamentos de superfície, os discos foram novamente submetidos a lixas abrasivas e de polimento, com granulação de 320, 400 e 600.

Quadro 1 - Tipos de tratamentos de superfícies realizados nas amostras estudadas

	Lixas abrasivas e de polimento de 320, 400 e 600 granulação	Polimento 600 granulação	Jateamento com micropartículas de Al_2O_3	2N H_2SO_4 12 horas	2N H_2SO_4 + 30% H_2O_2 12 horas
Lisa		x			
Microtopografia	x		x	x	
Nanotopografia	x		x		x

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 1 - Discos submersos em soluções preparadas para criar topografias de superfície em micro e em nanoescala, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Caracterização das superfícies

3.2.1 Difração de raios X (DRX)

Para a identificação de fases cristalinas específicas do titânio presentes nas amostras, foi utilizada a técnica de difratometria de raios X (PANalytical, modelo X'Pert Powder - fonte de raios X de cobre, $\lambda = 1,54060$ angstroms) no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) do Centro de Tecnologias Especiais (CTE) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Os parâmetros da análise foram: 2Theta (2θ) entre 10 e 90°, passo de 0,02° e tempo por passo de 20 segundos.

A identificação das fases cristalinas presentes nas amostras de titânio foi feita a partir da comparação com a simulação computacional dos difratogramas, utilizando-se a DRX. A partir desta comparação, obteve-se a indexação dos picos de difração e os valores de referência fornecidos pelo banco de dados Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) (Smith, Snyder, 1979).

3.2.2 Goniômetro

Para avaliação da molhabilidade, a técnica do goniômetro foi realizada pela mensuração do ângulo de contato (AC) formado entre uma gota de água e a superfície das amostras, que foram previamente lavadas com acetona P.A. (Sigma-Aldrich®) em ultrassom por 5 minutos. Em cada amostra foram colocadas duas gotas de água ($n=10$) na quantidade de 0,5 a 0,75 μL e os valores de ângulos de contato foram obtidos para cada gota sobre a superfície das amostras, utilizando um goniômetro Drop Shape Analyser 4500 (Kruss), no laboratório de biomateriais do departamento de Engenharia de Materiais da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG-UNESP).

As medidas foram feitas em atmosfera de laboratório com aproximadamente 60% de umidade. O equipamento é conectado a um computador com o software One Attention, o qual é o responsável por medir o AC pelo método da gota séssil. O valor

foi obtido 10 segundos após o gotejamento. A câmara acoplada ao goniômetro faz 50 tomadas por segundo e o AC formado é calculado.

3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os discos foram examinados sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução (Philips XL30 FEG, SEM, Philips, Eindhoven, Netherlands) do North Campus Research Complex (NCRC) da University of Michigan (UMICH), Ann Arbor - Michigan. As fotomicrografias foram feitas em três pontos escolhidos ao acaso nas superfícies dos discos de cada grupo em diferentes magnitudes.

Para a obtenção de imagens em maiores magnitudes das superfícies das amostras em micro e em nanoescala, utilizou-se o MEV com emissão de campo (TESCAN, modelo MEV-FEG MIRA3) do Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) no Centro de Tecnologias Especiais (CTE) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). As amostras foram previamente lavadas com acetona P.A. (Sigma-Aldrich®) em ultrassom por 5 minutos. As análises e imagens foram feitas em três pontos escolhidos ao acaso nas superfícies.

3.2.4 Perfilometria óptica

Para análise qualitativa da geometria tridimensional (3D) e para mensuração da microtopografia da superfície das amostras, utilizou-se um perfilômetro óptico (VEECO, modelo WYKO NT1100) do Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) no Centro de Tecnologias Especiais (CTE) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). O perfilômetro é conectado a um computador contendo o programa computacional Wyko Vision 32 (Wyko, Veeco, USA) para análise dos dados.

Foram feitas medições em diferentes áreas das amostras, sendo que cada área analisada possui comprimento de 301,3 μm e largura de 229,2 μm . Foi padronizada a escala do eixo z das imagens de forma a possibilitar a comparação entre a microtopografia das amostras. Dados de rugosidade aritmética média (R_a) e

área superficial média (Aa) também foram calculados para as amostras avaliadas e analisados estatisticamente pelo teste ANOVA Um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$).

3.2.5 Microscopia de força atômica (MFA)

Com o objetivo de se observar os diferentes graus de nanotexturização das amostras foi utilizado um microscópio de força atômica (VEECO, modelo MULTIMODE V), no modo de contato intermitente, com uma ponta de silício dopado com antimônio. A MFA utiliza uma ponta em cantilever que percorre a superfície do material, fazendo um escaneamento do movimento piezoelétrico gerado pela superfície contra a ponta montada no fim do cantilever. Esta técnica permite a avaliação qualitativa da topografia de superfície numa resolução próxima à atômica e a diferenciação de superfícies com diferentes graus de nanotexturização. O ensaio foi realizado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) do Centro de Tecnologias Especiais (CTE) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).

3.3 Cultura de células

Foram utilizadas uma linhagem de células tronco mesenquimais humanas (CTMh) (Lonza, Portsmouth, NH, USA), cultura primária de CTM obtidas da medula óssea de fêmures de camundongos osterix-mCherry (CTMc) e uma linhagem de células precursoras de osteoblastos, derivadas da calvária de camundongos neonatos (MC3T3-E1 subclones 14 e 42).

As células MC3T3-E1 foram doadas pelo pesquisador Renny Franceschi, da University of Michigan e os camundongos osterix-mCherry foram adquiridos da University of Connecticut (Strecker et al., 2013).

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da University of Michigan (UMICH), Ann Arbor - Michigan (UCUCA - protocolo

PRO00006203), para a utilização de CTMc obtidas da medula óssea de fêmures de camundongos.

Todas as células (CTMh, CTMc, MC3T3-E1) foram mantidas e expandidas em meio MEM- α modificado com Sais de Earle (MEM- α) (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado com soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e 10% de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina B) (Sigma-Aldrich® Chemical Co, St Louis, MO, USA). Esse meio foi denominado de meio regular. As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Foram usados também dois meios osteogênicos. O meio osteogênico 1 (Ost.1) incluiu o meio normal regular descrito acima e os suplementos osteogênicos de 100 nM de Dexametasona (Sigma-Aldrich®), 10 mM de glicerofosfato (Sigma-Aldrich®) e 0,2 mM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich®). O meio osteogênico 2 (ost.2) não incluiu a dexametasona, com o intuito de avaliar o efeito das superfícies na diferenciação das células. O quadro 2 mostra os suplementos utilizados no meio de cultura MEM- α .

Os meios DMEM F12 (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado com soro fetal bovino (Sigma-Aldrich® Chemical Co, St Louis, MO, USA) sem adição de antibiótico/antimicótico, regular e osteogênico 2, foram utilizados somente para o ensaio bioluminescente de luciferase. O quadro 3 mostra os suplementos utilizados no meio de cultura DMEM F12.

Para todos os ensaios realizados, foi adicionado os meios osteogênicos após 24 horas, o que representou o tempo inicial (t=0). Os meios foram trocados a cada três dias.

Quadro 2 - MEM- α e os suplementos utilizados

MEM-α	Soro fetal bovino 10% +Antibiótico e antimicótico	10 mM de glicerofosfato	0,2 mM de ácido ascórbico	100 nM de Dexametasona
Regular	x			
Osteogênico 1	x	x	x	x
Osteogênico 2	x	x	x	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 3 - DMEM F12 e os suplementos utilizados

DMEM F12	Soro fetal bovino 10%	Antibiótico e antimicótico	10 mM de glicerofosfato	0,2 mM de ácido ascórbico	100 nM de Dexametasona
Regular	x				
Osteogênico 2	x		x	x	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram plaqueadas 5×10^4 células nos discos de titânio preparados ($n=3$ para cada superfície) para os testes de avaliação da atividade da fosfatase alcalina (ALP), de mineralização (deposição de cálcio), de bioluminescência da luciferase (colágeno) e de expressão de genes osteogênicos (qPCR).

Para a observação das células aderidas sobre as superfícies em micro e nanoescala, utilizou-se CTMh cultivadas em MEM- α regular sobre os discos, por 24h.

Para o teste de ALP em CTMh e MC3T3-E1 subclone 42, as células foram cultivadas com os meios MEM- α regular e osteogênico 2, e coletadas após 3, 7 e 14 dias.

Para a análise de mineralização em células MC3T3-E1 subclone 42, utilizaram-se os meios MEM- α regular e osteogênico 2. Para as CTMh utilizou-se apenas o meio MEM- α osteogênico 1. Em ambos os casos, os testes foram realizados após 14 e 28 dias.

Para o ensaio bioluminescente de luciferase, as células MC3T3-E1 subclone 14 foram cultivadas nos meios DMEM F12 regular e osteogênico 2, após 48 horas.

Para a análise de qPCR, as células MC3T3-E1 subclone 42 foram mantidas nos meios MEM- α regular e osteogênico 2 por 7 dias.

A formação de colônias de osteoblastos por meio da atividade de ALP (UFC-Ob), foi analisada após 14 dias de cultivo de CTMc. Utilizaram-se 2×10^6 células, em meio de cultivo MEM- α regular.

Um resumo do tipo e quantidade de células, dos meios de cultura e dos períodos utilizados para cada ensaio encontra-se no quadro 4.

Quadro 4 - Ensaio e respectivo período de realização, de acordo com os meios de cultura, tipo e quantidade de células utilizadas. Para todos os ensaios utilizou-se n=3 para cada superfície

	ALP aos 3, 7 e 14 dias	UFC-Ob aos 14 dias	Mineralização aos 14 e 28 dias	Atividade de Luciferase após 48 horas	qPCR aos 7 dias	MEV após 24 horas
MEM- α Regular (CTMc - 2×10^6)		X				
MEM- α Regular (CTMh - 5×10^4)	X					X
MEM- α Osteogênico 1 (CTMh - 5×10^4)			X			
MEM- α Osteogênico 2 (CTMh - 5×10^4)	X					
MEM- α Regular (MC3T3-E1 subclone 42 - 5×10^4)					X	
MEM- α Osteogênico 2 (MC3T3-E1 subclone 42 - 5×10^4)	X		X		X	
DMEM F12 Regular (MC3T3-E1 subclone 14 - 5×10^4)				X		
DMEM F12 Osteogênico 2 (MC3T3-E1 subclone 14 - 5×10^4)				X		

Legenda: ALP (atividade da fosfatase alcalina); UFC-Ob (Unidades formadoras de colônias de osteoblastos); qPCR (expressão gênica); CTMh (células tronco mesenquimais humanas); CTMc (células tronco mesenquimais de camundongos); MC3T3-E1 (células pré-osteoblásticas murina).

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 MEV com células

Para a análise das células aderidas sobre as superfícies em micro e nanoescala, utilizaram-se células tronco mesenquimais humanas (CTMh) (Lonza,

Portsmouth, NH, USA) cultivadas sobre os discos por 24h. Após esse período, os discos foram lavados cuidadosamente com PBS e imediatamente fixados em paraformaldeído (Z-Fix) por 1 hora.

Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com PBS frio (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e desidratadas numa série graduada de concentrações de etanol de 10% a 100% durante um período de 1 hora e 30 minutos. A desidratação em etanol a 100% foi realizada por três vezes. Após desidratação, adicionou-se hexametilsilazano (Sigma-Aldrich®) e aguardou-se evaporação completa do conteúdo sob o fluxo laminar. Após isso, as amostras foram preparadas e pulverizados com paládio-ouro para posterior análise.

3.5 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi medida aos 3, 7 e 14 dias, em CTMh e em MC3T3E1-subclone 42, sob os meios regular e osteogênico 2 (Quadro 4). Os poços foram lavados 2 vezes com PBS frio e as células lisadas usando 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich®). O lisado foi coletado em tubos de 1,5 mL e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos para posterior coleta do sobrenadante, o qual foi utilizado na análise. A atividade de ALP nos lisados celulares foi testada utilizando 40 µL de cada amostra numa placa de 96 poços, adicionando 200 µL de fosfato de p-nitrofenol (p-NPP) (BluePhos® Microwell Phosphatase Substrate System. KPL, Gaithersburg, MD, USA) e determinado espectrofotometricamente (Leitor de Microplacas, PowerWave HT - BioTek Instruments Seattle, WA, USA).

A atividade de ALP (unidades/mL) foi normalizada com a quantidade de proteína total de cada amostra. A análise do conteúdo de proteína total foi realizada utilizando o kit de ensaio de Proteína (Precision Red Advanced Protein Assay, Cytoskeleton INC, Denver, CO, USA) e determinado espectrofotometricamente (Leitor de Microplacas, PowerWave HT).

3.6 Unidades formadoras de colônias de osteoblastos por meio da atividade da fosfatase alcalina (UFC-Ob)

Para a avaliação da formação de colônias de osteoblastos sobre as superfícies, utilizou-se cultivo primário de CTMc obtidas da medula óssea de fêmures de camundongos (OSX-mCherry), com dois meses de vida.

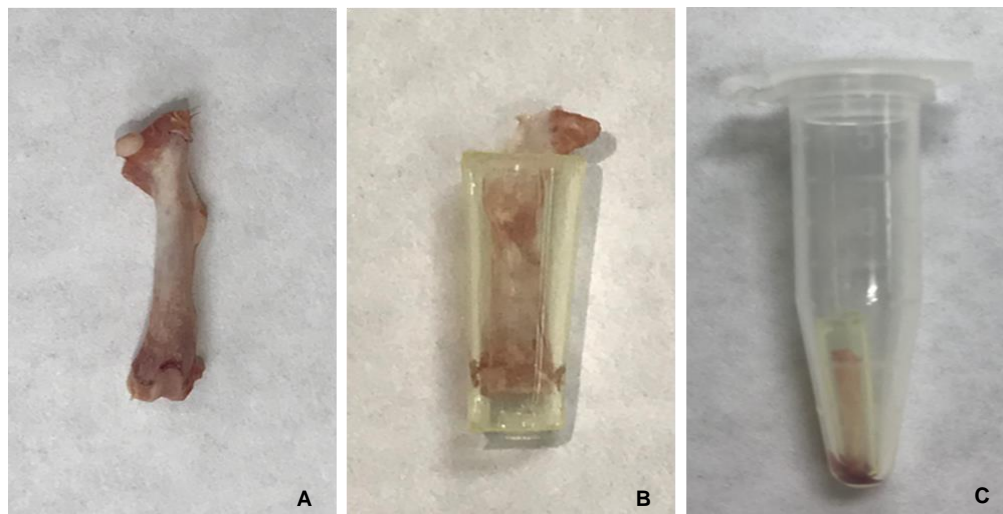
Utilizaram-se 2×10^6 células por poço nos discos de titânio preparados (n=3 para cada superfície) e somente células (sem discos) em três poços distintos, como controle. As células foram cultivadas em meio regular e realizou-se o teste de coloração após 14 dias.

Para isso, os fêmures dos animais foram centrifugados a 15,000 rpm por 5 minutos, dentro de ponteiras de 200 μ L cortadas que foram colocadas em eppendorfs de 1,5 mL (Figura 2). Após a obtenção do *pellet*, as células foram ressuspensas em meio regular para contagem e plaqueamento.

Após isso, os discos foram lavados 2 vezes com 2 mL de PBS frio e as células foram fixadas com 2 mL de formaldeído por 10 minutos. Após a fixação, os discos foram lavados novamente conforme descrito anteriormente.

A solução de coloração (Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit, Sigma-Aldrich®) continha 125 μ L de cada reagente (Sodium Nitrite Solution; FRV-Alkaline Solution; e Naphthol AS-BI Alkaline Solution) dissolvidos em água purificada. Utilizou-se 2 mL da solução por poço. As placas foram cobertas com papel alumínio, e após uma hora de incubação dos reagentes, foram fotografadas. As colônias foram contadas manualmente com o uso do programa ImageJ 1.3p (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Figura 2 - Forma de obtenção das CTMc para cultivo primário



Legenda: Fêmur de camundongo (A); Fêmur sem epífises dentro da ponteira de 200 μ L (B); *Pellet* de CTM obtido após centrifugação (C).

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7 Análise de mineralização (deposição de cálcio)

Para quantificar o grau de mineralização utilizaram-se CTMh sob meio osteogênico 1 e células MC3T3-E1 subclone 42 sob os meios regular e osteogênico 2, aos 14 e 28 dias (Quadro 4). No final dos períodos experimentais, os poços com as células foram lavados com PBS frio e as células foram lisadas usando uma solução de 0,5 N de HCl. O sobrenadante resultante foi utilizado para a medição da deposição de cálcio utilizando o kit comercial de ensaio de cálcio (Calcium (CPC) LiquiColor® Test, Stanbio Laboratory, Boerne, TX, USA).

Resumidamente, o lisado contendo HCl foi pipetado, colocado em tubo de 1,5 mL e deixado sob agitação durante 24 horas a 4°C. Após isso, os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 12,000 g e foi coletado somente o sobrenadante de cada amostra. A absorbância foi determinada por meio do espectrofotômetro (PowerWave HT, BioTek) utilizando 20 μ L de cada amostra em uma placa de 96 poços, adicionado 200 μ L de solução do kit.

3.8 Ensaio bioluminescente de luciferase com plasmídeo do gene *Col 5a3*

Utilizaram-se as células MC3T3-E1 subclone 14 transfectadas com o plasmídeo do gene *Col5a3*, para a avaliar a atividade da luciferase relacionada à expressão desse gene, sob os meios regular e Ost.2, após 48 horas (Quadro 4). Após a transfecção, as células passam a conter cópias transfectadas estáveis do promotor do gene, controlando o gene repórter da luciferase *firefly*.

O gene *Col5a3* foi inserido em um plasmídeo bacteriano (*Escherichia coli*) para a clonagem gênica. O DNA do plasmídeo bacteriano (*Col5a3*) foi extraído de acordo com o protocolo do Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). O *pellet* contendo o plasmídeo foi ressuscitado em 250 µL de solução de ressuspensão celular (CRA), seguido da adição de 250 µL de solução de lise celular (CLA). As soluções foram misturadas manualmente e após isso, 10 µL de protease alcalina foram adicionados para posterior incubação em temperatura ambiente (T.A) por 10 minutos.

As amostras foram transferidas para um tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 350 µL de solução de neutralização (NBS) e misturou-se manualmente. Após isso, centrifugou-se a 14,000 rpm por 10 minutos em T.A. O sobrenadante obtido foi transferido para as colunas de tubos coletores e nova centrifugação foi realizada em velocidade máxima por um minuto. Foram adicionados 750 µL da solução de lavagem (Wash Solution) e centrifugado novamente em velocidade máxima por um minuto. O passo anterior foi repetido utilizando-se 250 µL de solução de lavagem e centrifugação por 2 minutos.

A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e 20 µL de água nuclease-free foram adicionados na coluna para posterior centrifugação a 14,000 rpm por um minuto. Após isso, adicionou-se mais 20 µL de água nuclease-free, e fez-se nova centrifugação semelhante à anterior, para posterior quantificação do DNA obtido.

O DNA do plasmídeo do gene *Col 5a3*, foi incorporado nas células por meio do agente de transfecção FuGene (Promega, Madison, WI, USA). Para a transfecção, foi utilizado o meio Opti-MEM™ (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY, USA) sem adição de antibiótico e antimicótico. Inicialmente, 2,79 µL de FuGene foi adicionado a 49,15 µL de meio e incubado por 5 minutos à T.A. Posteriormente, 2,5

μL (equivalentes a $100\text{ng}/\mu\text{L}$) do plasmídeo *Col 5a3* juntamente com $0,62 \mu\text{L}$ (equivalentes a $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$) do plasmídeo pRL-TK (controle interno da atividade da luciferase), foram adicionados à mistura anterior e incubados por 20 minutos à T.A. Por fim, $50 \mu\text{L}$ da mistura foram colocados diretamente na superfície dos discos. Após isso, 5×10^4 células (MC3T3E1 subclone 14) foram adicionadas na superfície de cada disco.

Após 24 horas, os meios DMEM F12 regular e Ost.2 foram preparados e adicionados aos discos, indicando tempo inicial igual a 0 ($t=0$).

Passadas 48 horas da transfecção e da diferenciação dos meios, as células foram lavadas com PBS frio e lisadas com $100 \mu\text{L}$ de PLB (Passive Lysis Buffer 1X, Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega). A absorbância foi determinada espectrofotometricamente utilizando $40 \mu\text{L}$ de cada amostra em uma placa de 96 poços (PowerWave HT, BioTek). Foram utilizados $50 \mu\text{L}$ dos reagentes LAR (Luciferase Assay Reagent) que mede a atividade da *firefly luciferase* e STOP e GLO, que mede a atividade da *renilla* por amostra. A *renilla* é utilizada para normalizar a atividade da luciferase.

3.9 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)

3.9.1 Extração do RNA das células sobre os discos

A extração do RNA total das células foi realizada com o reagente TRIzol™ (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante.

Resumidamente, as células foram lavadas com PBS frio e, posteriormente adicionou-se 1 mL de TRIzol™ sobre os discos. O conteúdo foi transferido para um eppendorf de 1.5 mL e incubado por 5 minutos. Acrescentou-se 200 µL de clorofórmio e, em seguida, homogeneizou-se o conteúdo com vortex por 15 segundos e, após isso, incubou-se por 5 minutos. Realizou-se centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novos tubos contendo 500 µL de isopropanol e o conteúdo foi incubado por 10 minutos em T.A. Realizou-se centrifugação 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e sugou-se o sobrenadante. O *pellet* foi lavado com álcool a 75%. Realizou-se centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O *pellet* então foi ressuspendido em água RNase free.

A quantidade de RNA foi verificada por meio de leitura em espectrofotômetro (PowerWave HT – BioTek) e do programa Gen5™ (BioTek).

Os RNAs utilizados apresentaram pureza entre 1,8 e 2,0.

3.9.2 Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido com reações de transcrição reversa seguindo instruções do fabricante do Kit comercial SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Foram utilizados 500 ng de RNA total, extraído das células sobre os discos mais água RNase free suficiente para completar o volume final de 14 µL. Utilizou-se 4 µL do VILO Reaction Mix 5X, mais 2 µL do Enzyme Blend, contendo a SuperScript III Reverse Transcriptase (RT) 10X, totalizando 20 µL por amostra. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C e por fim, 5 minutos por 85°C e

mantidas no termociclador a 4°C para posterior armazenamento a 20°C ou preparo das reações para qPCR.

3.9.3 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)

A análise da expressão gênica foi realizada em MC3T3-E1 subclone 42 sob os meios de cultura regular e osteogênico 2, após 7 dias (Quadro 4).

Foram utilizados os primers dos genes *Runx2* (Runt relacionado ao fator de transcrição 2), *Satb2* (Sat homeobox 2), *Sp7* (osterix), *Prrx1* (Homeobox 1 relacionado emparelhado), *Bmp2* (Proteína morfogenética óssea 2), *Alp* e *Ibsp* (sialoproteína óssea), disponíveis comercialmente (RT² qPCR™ Primer Assay - Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA) para PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

As reações foram preparadas utilizando 1,0 µL de cDNA, 1,0 µL de primer, 12,5 µL de RT² SYBR® Green qPCR Mastermix (Qiagen) mais 10,5 µL de água RNase free, totalizando 25 µL, de acordo com o protocolo do fabricante.

A expressão gênica foi determinada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*fold change*) e expressa como nível de expressão relativa a um alvo-interno de referência (superfície lisa de 7 dias) com valor de expressão igual a 1. O gene *Gapdh* (gene endógeno constitutivo), foi utilizado como normalizador. Análise estatística descritiva foi calculada usando Microsoft Excel. O teste -T foi realizado para múltipla comparação dos níveis de expressão gênica com a superfície lisa no período de 7 dias. Utilizou-se termociclador ABI 7000 para Real-time PCR (Applied Biosystems).

3.10 Análise estatística

Para os ensaios de goniômetro, rugosidade aritmética média (Ra), área superficial média (Aa) e UFC-Ob foi utilizado ANOVA Um fator seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, quando necessário. Para os ensaios de atividade de ALP, deposição de cálcio e bioluminescência de luciferase foi utilizado o ANOVA Dois

fatores, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, quando necessário. O software utilizado para análise estatística foi GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software INC, La Jolla, CA, USA).

Os resultados qPCR foram mostrados de acordo com os valores em “fold change” (expressão gênica relativa ao grupo controle). O Teste T foi utilizado como teste estatístico para comparação entre o controle (superfície lisa) e os demais grupos (superfícies em micro e nanoescala), após 7 dias de cultivo celular. As análises foram realizadas utilizando-se a ferramenta “RT² Profiler PCR array Data Analysis” (versão 3.5)*.

Para todas as análises estatísticas, o nível de significância adotado foi de $p > 0,05$.

* Disponível online pelo endereço <http://sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>.

4 RESULTADO

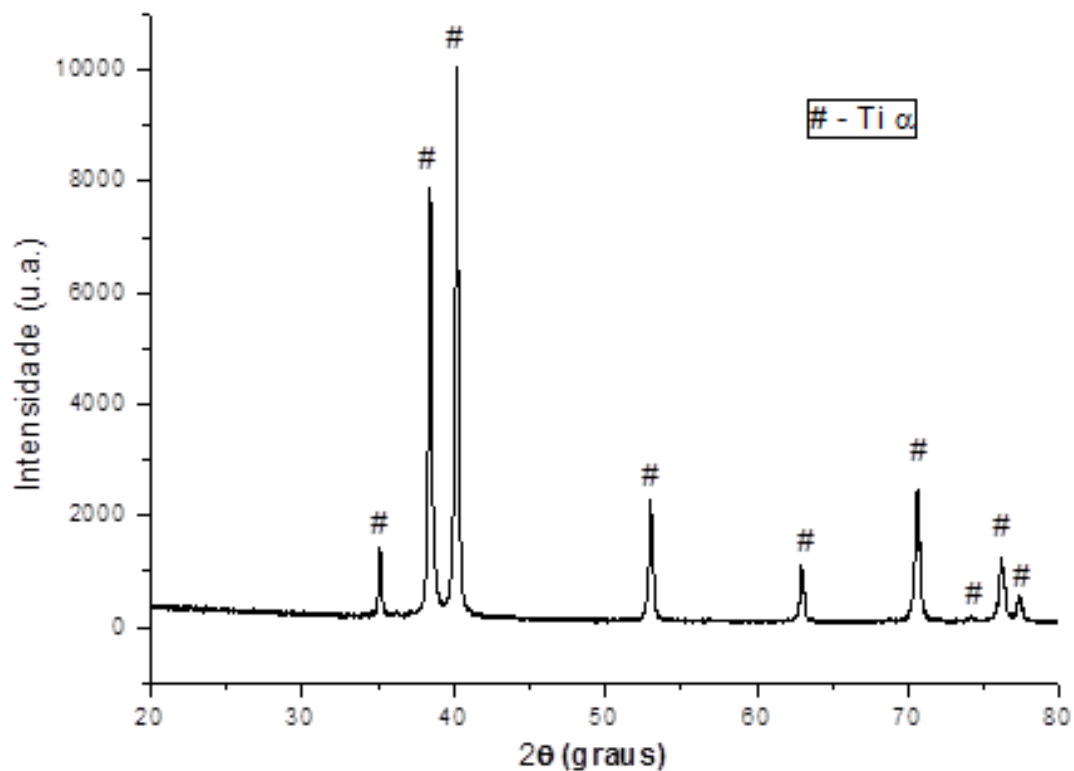
4.1 Difração de raios X (DRX)

A identificação das fases cristalinas presentes nas amostras de titânio, antes e após tratamentos de superfície, foi feita a partir da comparação dos difratogramas com os valores de referência fornecidos pelo banco de dados Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS). A partir desta comparação, obteve-se a indexação dos picos de difração e posterior identificação das fases.

A presença da fase α existente nas amostras de titânio, que apresenta estrutura cristalina hexagonal compacta (hc), foi identificada nos difratogramas de raios X em todas as amostras estudadas (Figuras 3, 4 e 5).

A figura 3, mostra espectros de DRX obtidos da amostra de TiCP grau IV lisa, apresentando picos obtidos com intensidades distintas para fase α do titânio. Os picos foram determinados após análise e confronto com o banco de dados das fichas do JCPDS.

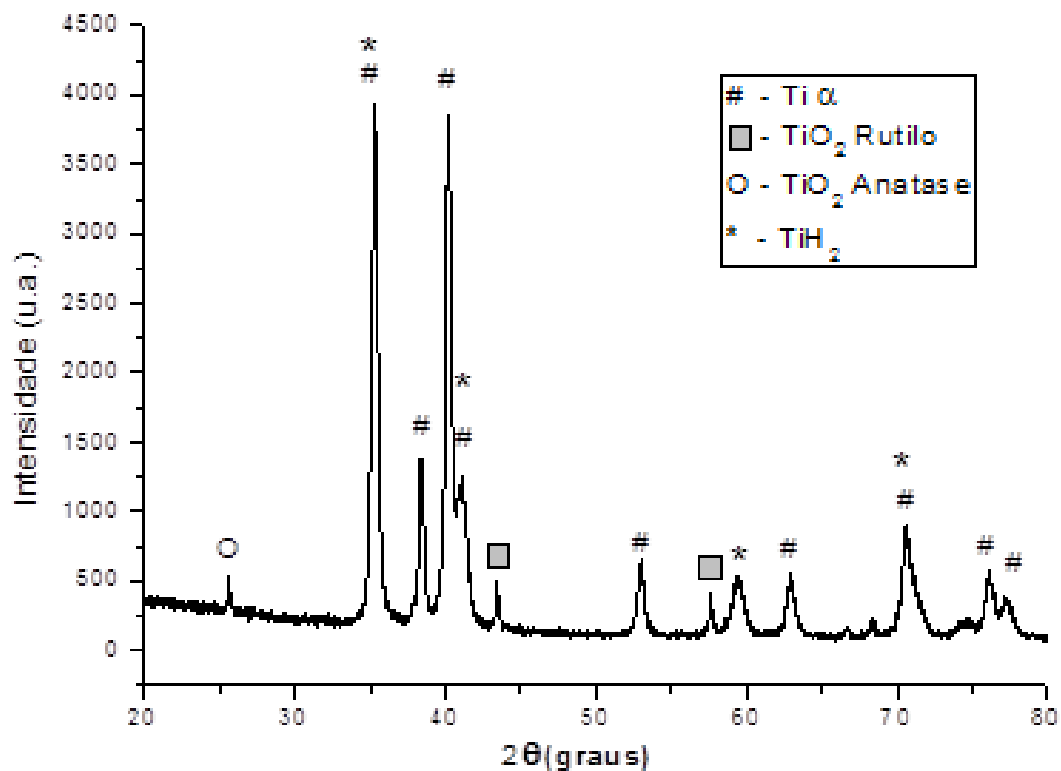
Figura 3 - Difractometria de raios X da amostra com superfície lisa. Determinaram-se picos de raios X característicos da fase α do titânio



Legenda: Difractograma de raios X da amostra de TiCP com topografia lisa.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 4, mostra espectros de DRX obtidos da amostra de TiCP grau IV com topografia em microescala, apresentando picos obtidos com intensidades distintas para as fases α do titânio, rutilo, anatase e hidreto de titânio (TiH_2). Os picos foram determinados após análise e confronto com o banco de dados das fichas do JCPDS.

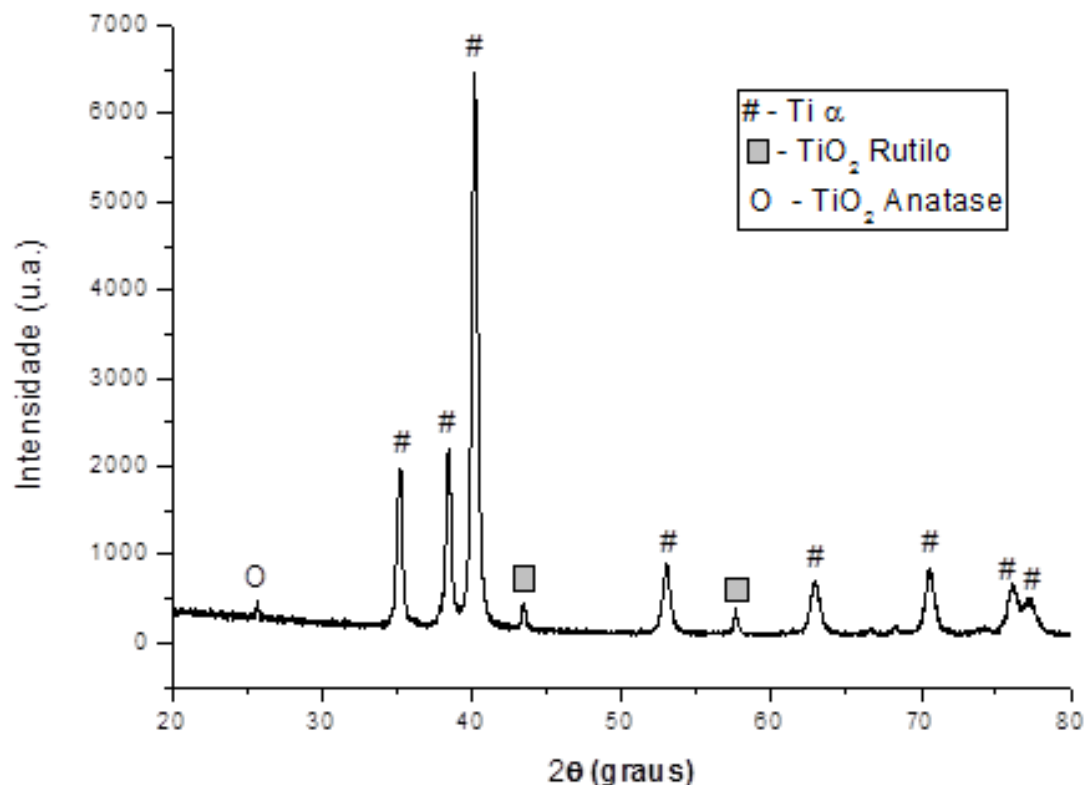
Figura 4 - Difratomia de raios X da amostra de TiCP com topografia em microescala. Determinaram-se picos de raios X característicos das fases α - titânio, rutilo, anatase e TiH_2



Legenda: Difrátograma de raios X da amostra de TiCP com topografia em microescala.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 5, mostra espectros de DRX obtidos da amostra de TiCP grau IV com topografia em nanoescala, apresentando picos obtidos com intensidades distintas para as fases α do titânio, rutilo e anatase. Os picos foram determinados após análise e confronto com o banco de dados das fichas do JCPDS.

Figura 5- Difratometria de raios X da amostra de TiCP com topografia em nanoescala. Determinaram-se picos de raios X característicos das fases α , rutilo e anatase do titânio



Legenda: Difratograma de raios X da amostra de TiCP com topografia em nanoescala.
Fonte: Elaborado pelo autor.

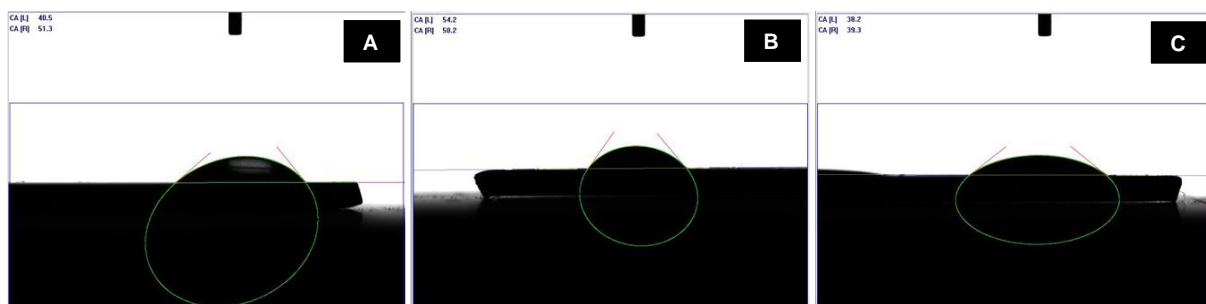
4.2 Goniômetro

A avaliação da molhabilidade foi realizada pela mensuração do AC formado entre uma gota de água e a superfície das amostras lisa e com topografias em micro e nanoescala (Figura 6). Os valores de média e desvio padrão dos dados de AC obtidos, seguem descritos na tabela 1.

A média dos AC obtida nas amostras foi de 65° para as amostras com superfície lisa e em nanoescala e de 82° para a amostra com superfície em microescala. Todas as médias encontradas foram menores do que 90° caracterizando a hidrofiliabilidade das superfícies. Na figura 6, podemos observar algumas das medidas de AC feitas sobre as superfícies estudadas.

Não foi observada diferença estatística significativa após análise de variância (ANOVA). Um fator entre as amostras estudadas (Figura 7).

Figura 6 – Imagens de gotas de água sobre as superfícies das amostras no teste do goniômetro



Legenda: Medidas de AC para a superfície lisa (A), para a superfície em microescala (B) e em nanoescala (C).

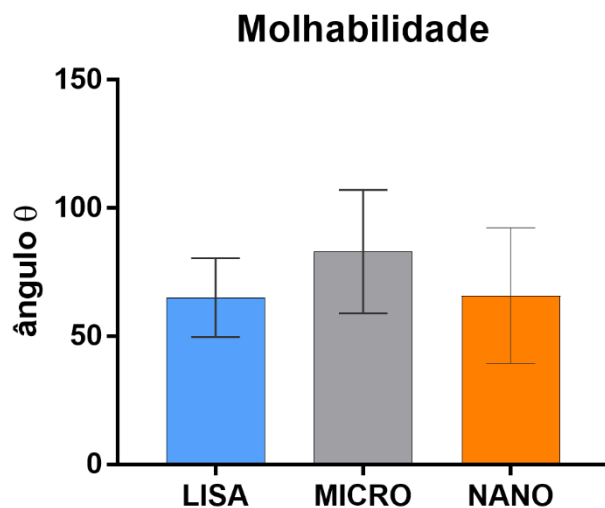
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1 – Valores de média e desvio padrão, dos dados de AC obtidos no teste goniômetro, sobre as superfícies das amostras estudadas

Goniômetro	LISA		MICRO		NANO	
	Média	DV	Média	DV	Média	DV
AC (θ)	65.07	15.35	82.96	24.04	65.87	26.43

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Gráfico representativo das médias dos AC, obtidas no teste do goniômetro, para as superfícies estudadas



Fonte: Elaborado pelo autor.

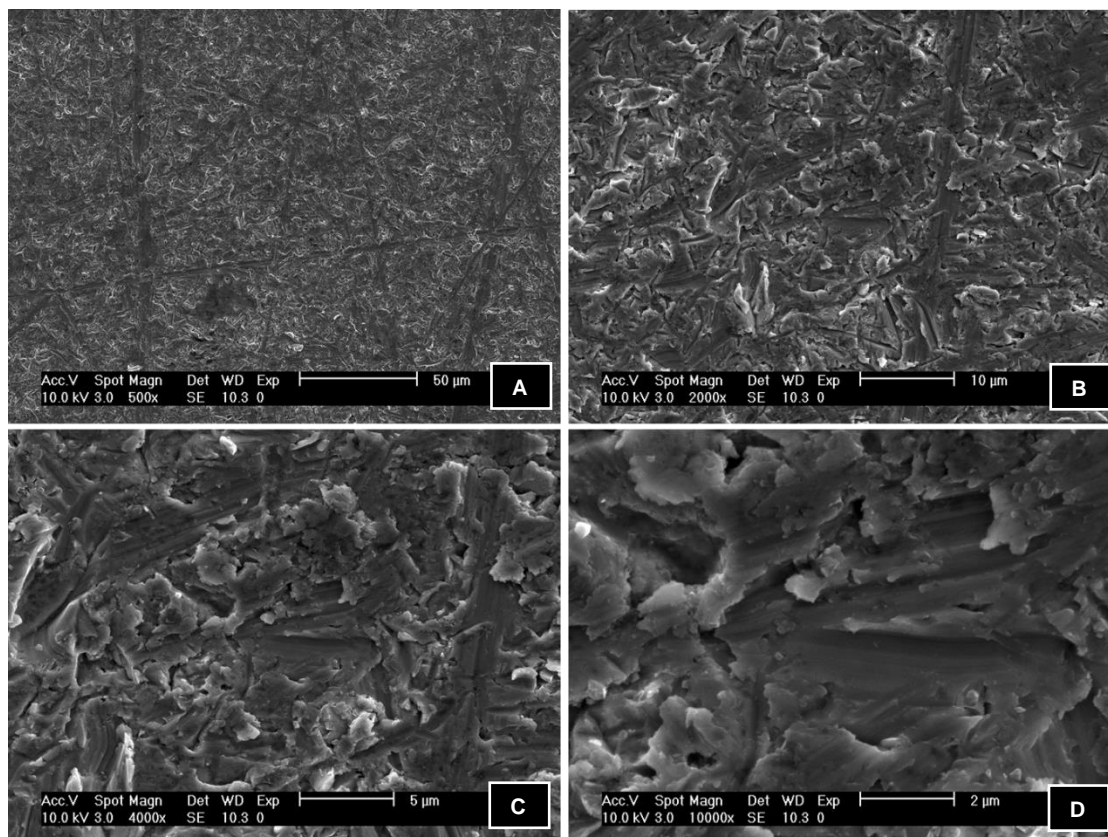
4.3 Análise das superfícies por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na avaliação das superfícies sob MEV, observaram-se superfícies lisa e com micro e nanotopografias, obtidas como explicado anteriormente (Quadro 1). Diferenças na topografia das superfícies foram vistas nos diferentes grupos. As topografias em micro e nanoescala (Figuras 9 a 12) mostraram maior porosidade e rugosidade do que a observada na superfície lisa (Figura 8).

Nas imagens seguintes (Figuras 8 a 12), pode-se observar as características das superfícies estudadas.

O polimento com lixa de 600 de granulação, nas superfícies lisas, resultou na obtenção de ranhuras e microestruturas irregulares, ora pontiagudas e anguladas como pode ser observado na figura 8.

Figura 8 - Superfície com topografia lisa

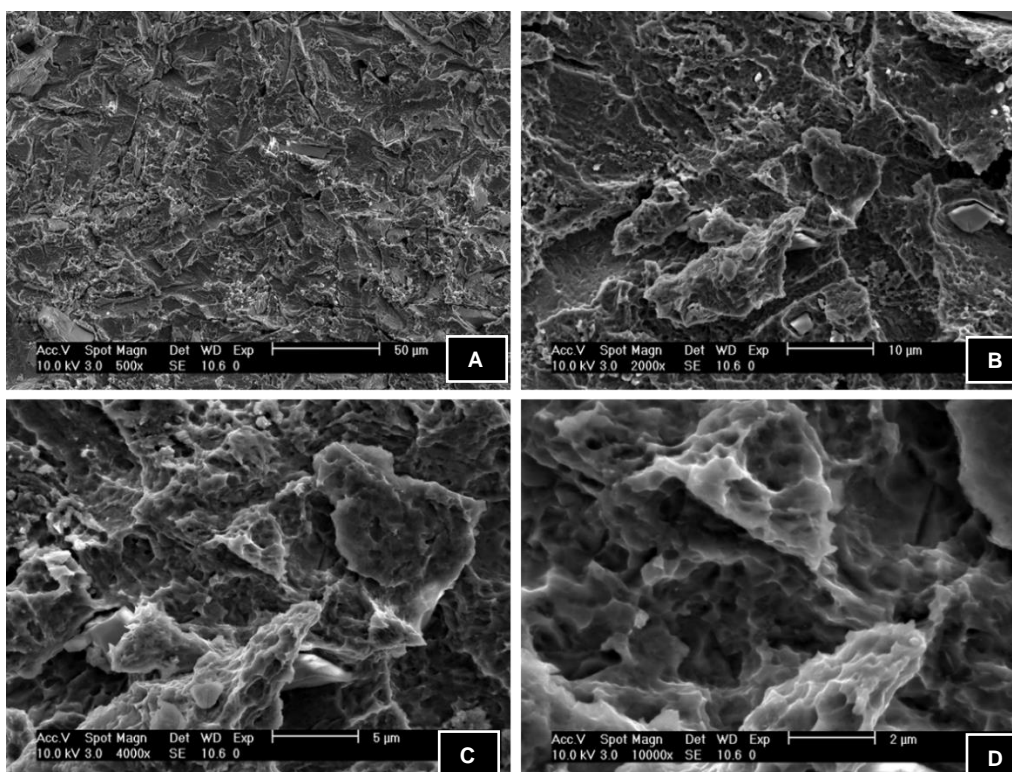


Legenda: Superfície lisa em aumentos de 500x (A), 2000x (B), 4000x (C) e 10000x (D).

Fonte: Elaborado pelo autor.

O jateamento e o condicionamento ácido para a criação de topografia em microescala, resultou na obtenção de concavidades porosas (Figura 9) com variadas dimensões, como pode ser observado na figura 10 B. As imagens da figura 10 foram obtidas sob MEV com emissão de campo (MEV-FEG).

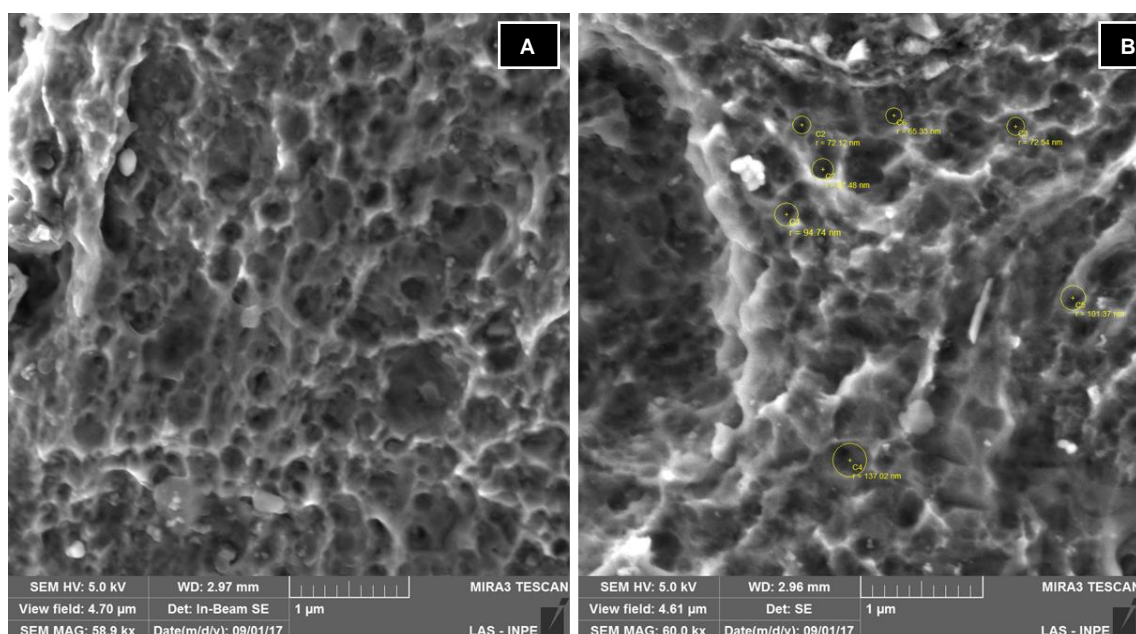
Figura 9 - Superfície com topografia em microescala



Legenda: Características microtopográficas com aumentos de 500x (A), 2000x (B), 4000x (C) e 10000x (D).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Superfície com topografia em microescala

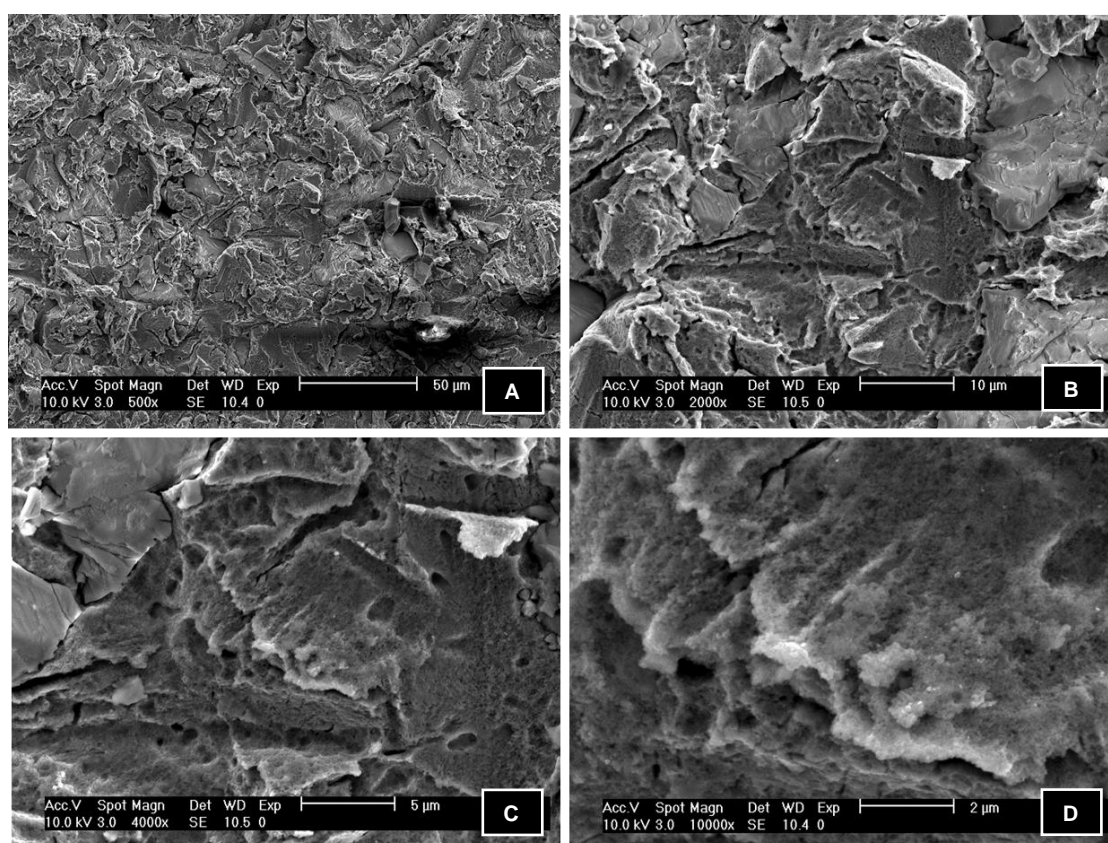


Legenda: Características microtopográficas com aumentos de 58900x (A), 60000x (B) com medições dos raios dos poros em escala submicrométrica (entre 100 e 1000 nm).

Fonte: Elaborado pelo autor.

O tratamento de superfície utilizado para a criação de topografia em nanoescala, resultou na obtenção de poros e nanoestruturas sobre as concavidades porosas da superfície microtexturizada (Figura 11). Poros entre 3 micrometros e 100 nanometros, com diâmetro equivalente médio de 50 nanometros e, nanoestruturas arredondadas com diâmetro equivalente médio de aproximadamente 20 nanometros, podem ser observados (Figura 12 B). As imagens da figura 12 foram obtidas sob MEV-FEG.

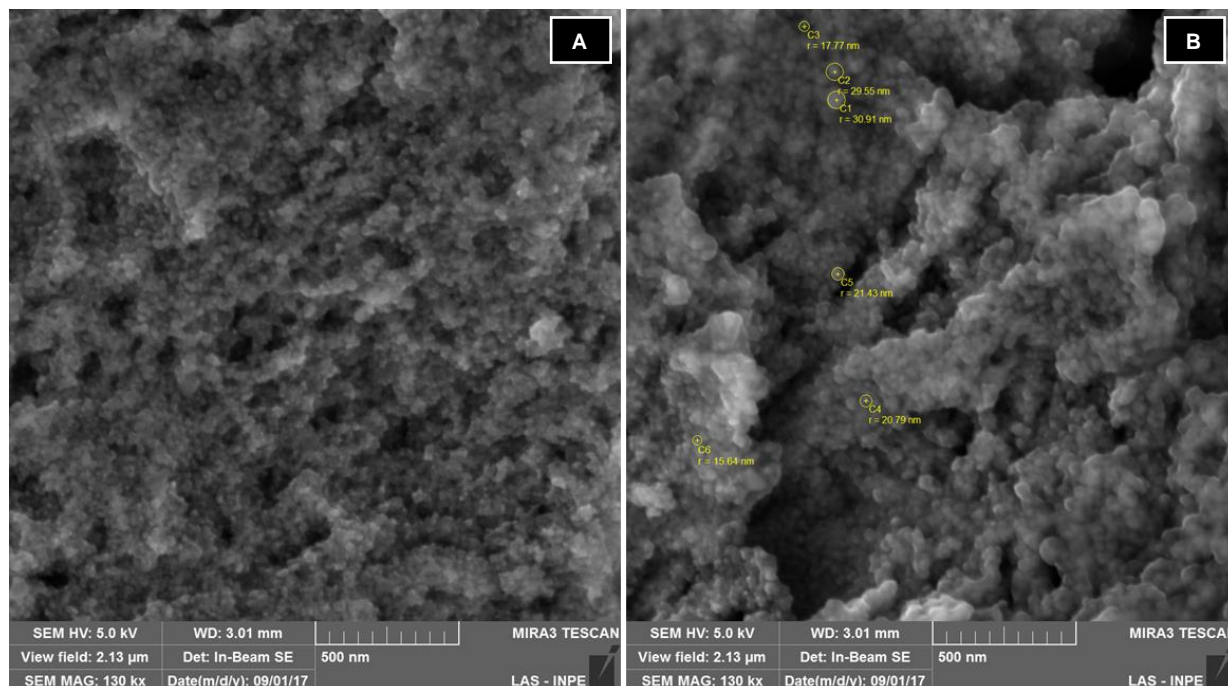
Figura 11 - Superfície com topografia em nanoescala



Legenda: Características nanotopográficas com aumentos de 500x (A), 2000x (B), 4000x (C) e 10000x (D).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 - Superfície com topografia em nanoescala



Legenda: Características nanotopográficas com aumentos de 130000x (A), 130000x (B) com nanoporos e medições das nanoestruturas arredondadas em escala nanométrica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Perfilometria óptica

A técnica de perfilometria óptica foi utilizada para análise de parâmetros quantitativos da microtopografia das amostras. Essa técnica também permitiu a análise da rugosidade superficial por perfilometria digital 3D.

Para o cálculo das imagens de perfilometria, dados foram obtidos e registrados ao longo da superfície selecionada, como uma distribuição de alturas (picos e vales) gerando um grande número de perfis.

A rugosidade aritmética média (R_a) é um dos parâmetros mais utilizados para caracterizar a topografia de superfície. Valores de rugosidade superficial média (R_a) em μm , valores de área superficial média (A_a) em mm^2 e valores de desvio padrão (DV) foram obtidos para as diferentes amostras. Os resultados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Valores obtidos por perfilometria óptica das amostras estudadas

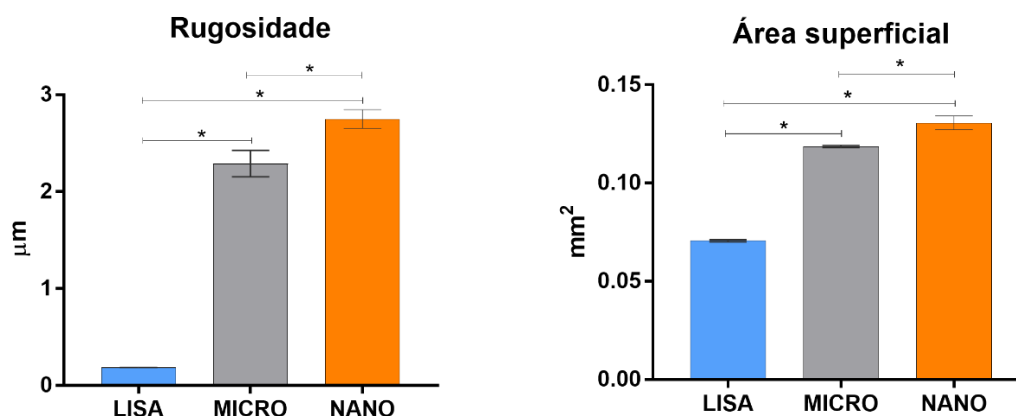
	LISA		MICRO		NANO	
	Média	DV	Média	DV	Média	DV
Ra	0.18	0.01	2.29	0.14	2.75	0.10
Aa	0.07	0.00	0.12	0.00	0.13	0.00

Legenda: Valores de rugosidade superficial média em μm (Ra), de área superficial média em mm^2 , (Aa) e desvio padrão (DV) obtidos por perfilometria óptica das superfícies lisa, em micro e nanoescala.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi observada diferença estatística, após ANOVA Um fator seguida do teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$), entre as amostras estudadas, para a Ra e a Aa.

Os valores de p obtidos para Ra e Aa, entre as superfícies lisa e microtexturizadas e lisa e nanotexturizadas, foi de $p < 0,0001$. Entre as superfícies micro e nanotexturizadas, o valor de p obtido para Ra foi de $p = 0,002$ e de Aa foi de $p = 0,001$. Essas diferenças, foram indicadas por (*) no gráfico. (Figura 13).

Figura 13 – Gráficos representativos dos números médios obtidos para a Ra (μm) e para a Aa (mm^2) das amostras com diferentes topografias de superfície



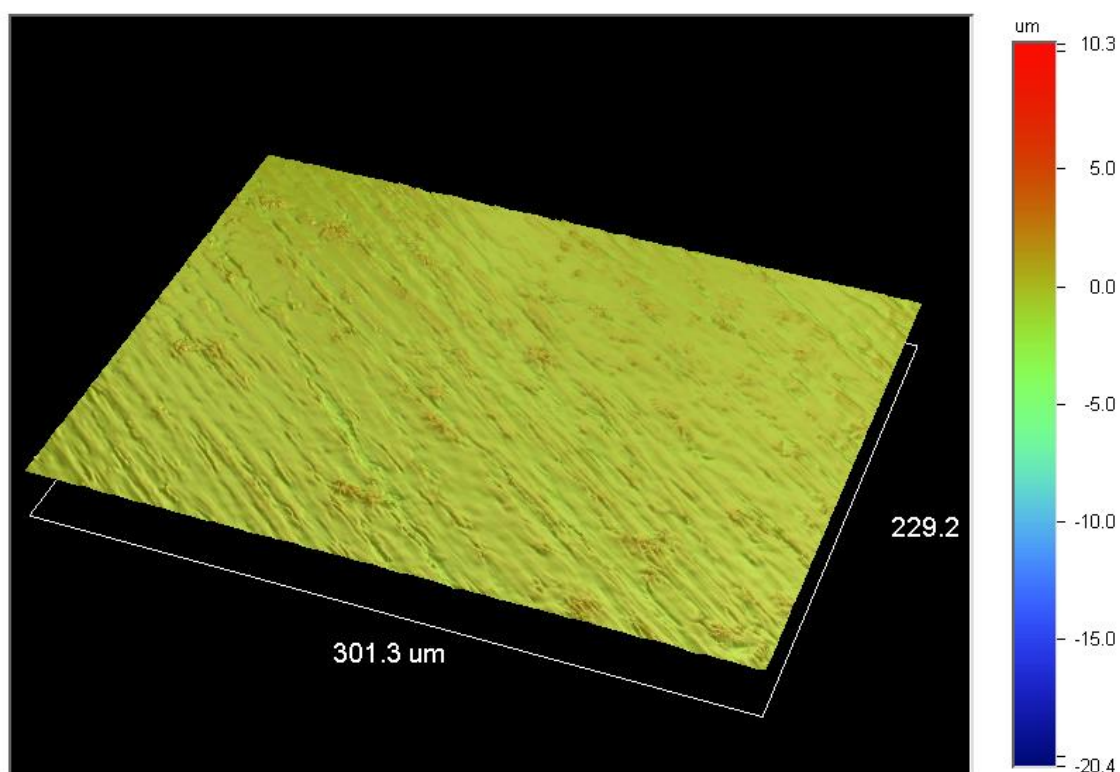
Legenda: (*) indica diferença estatística entre diferentes amostras.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Observaram-se picos e vales nas amostras estudadas. Foi padronizada a escala do eixo Z das imagens numa variação de rugosidade total (Rt) de 30,7 μm , de forma a possibilitar a comparação entre a microtopografia das mesmas.

As superfícies em micro e nanoescala apresentaram Ra 12 e 15 vezes maior, respectivamente, do que a superfície lisa.

A figura 14 mostra a micrografia em perfilômetro óptico da amostra lisa, onde observamos ranhuras irregulares no mesmo sentido do polimento realizado para o preparo da superfície.

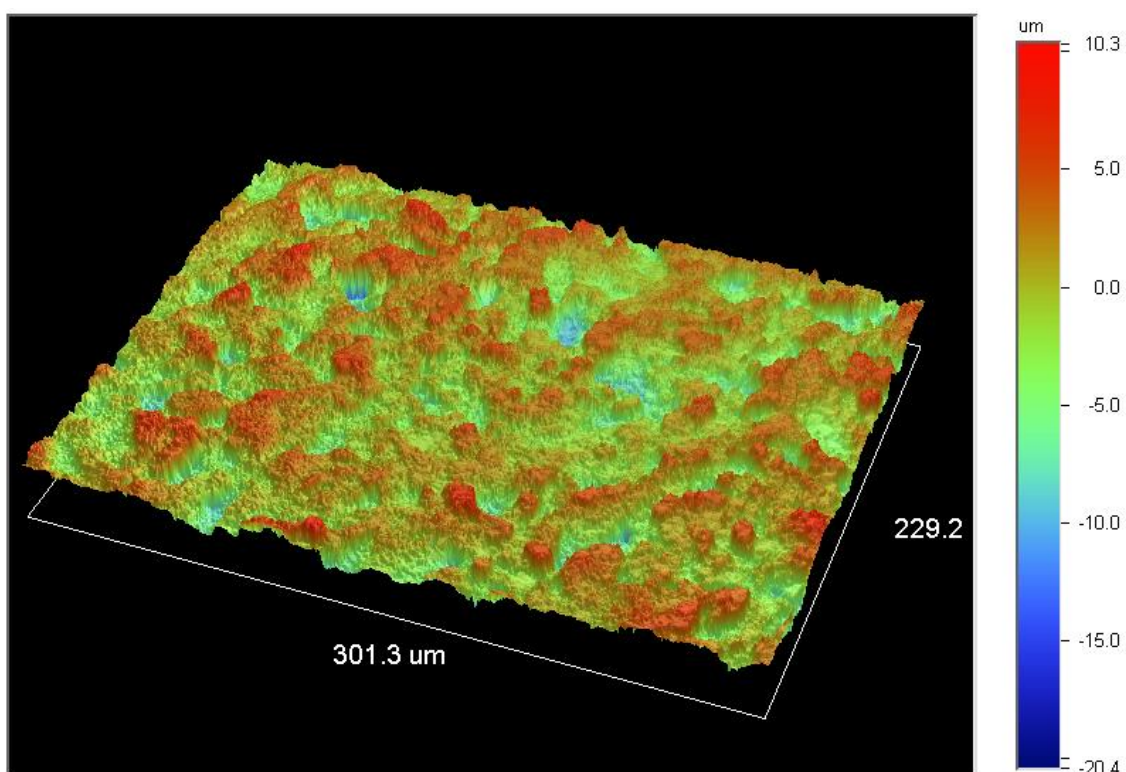
Figura 14- Micrografia em perfilômetro óptico da amostra lisa



Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 15 mostra a micrografia em perfilômetro óptico da amostra com topografia em microescala. Superfície rugosa com microestruturas porosas e estruturas arredondados nos picos foram observadas.

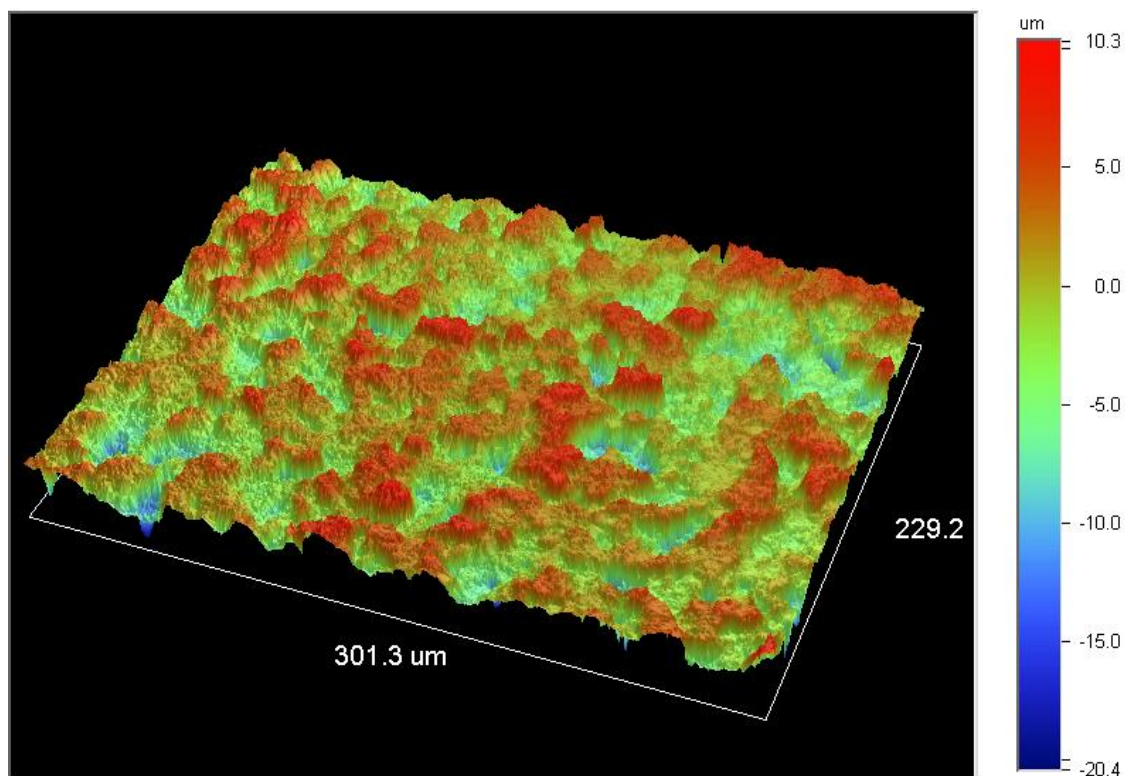
Figura 15 - Micrografia em perfilômetro óptico da amostra com topografia em microescala



Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 16 mostra a micrografia em perfilômetro óptico da amostra com topografia em nanoescala. Observaram-se microestruturas porosas com grande quantidade de estruturas de formato irregular nos picos.

Figura 16 - Micrografia em perfilômetro óptico da amostra com topografia em nanoescala



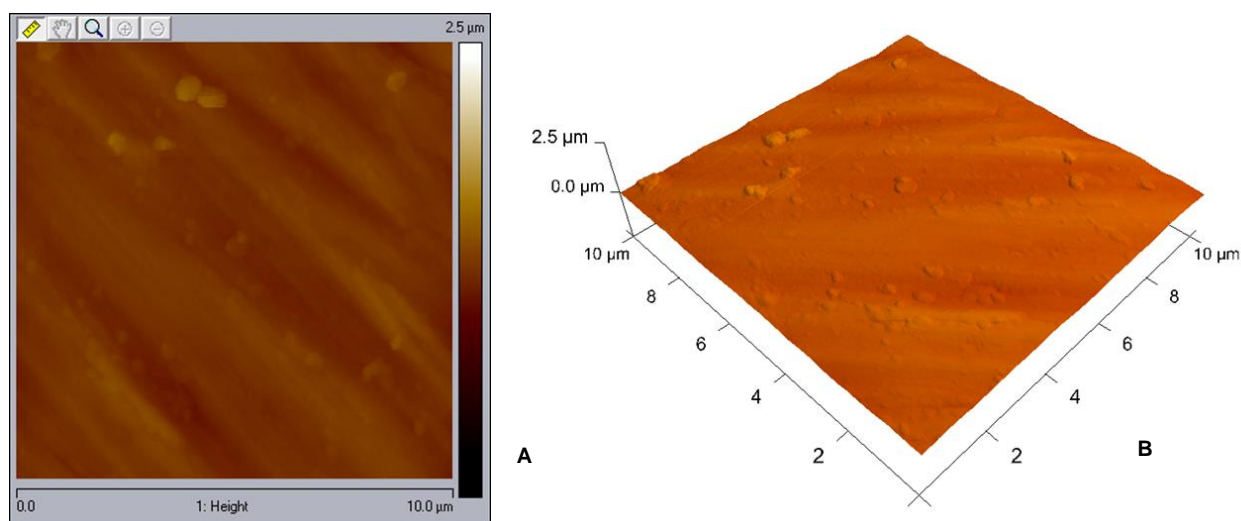
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Microscopia de força atômica (MFA)

A avaliação qualitativa das topografias de superfícies lisa, em microescala e em nanoescala foi feita por meio da MFA. Diferenças de texturização foram observadas entre as amostras.

A figura 17 mostra a MFA da amostra com topografia de superfície lisa. A superfície lisa apresentou leve irregularidade, com ranhuras provenientes da etapa de polimento (Figura 17A). Observa-se na imagem 3 D algumas ranhuras e algumas microestruturas pequenas e arredondadas (Figura 17B).

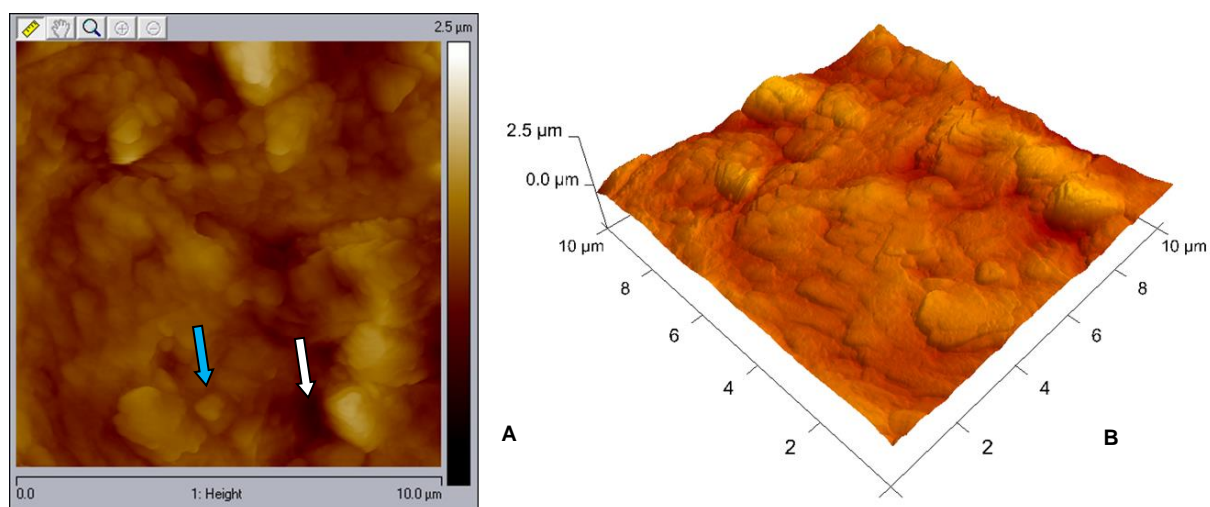
Figura 17 – Microscopia de força atômica da amostra com topografia de superfície lisa com área de 10 μm x 10 μm



Legenda: Imagens obtidas por MFA em 2 D (17A) e 3 D (17B) da superfície com topografia lisa.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 18 mostra a MFA da amostra com topografia em microescala. Microporos e picos microtexturizados arredondados, podem ser vistos na figura 18A. Picos microtexturizados arredondados de tamanhos e alturas variadas foram observados na imagem 3 D (Figura 18B).

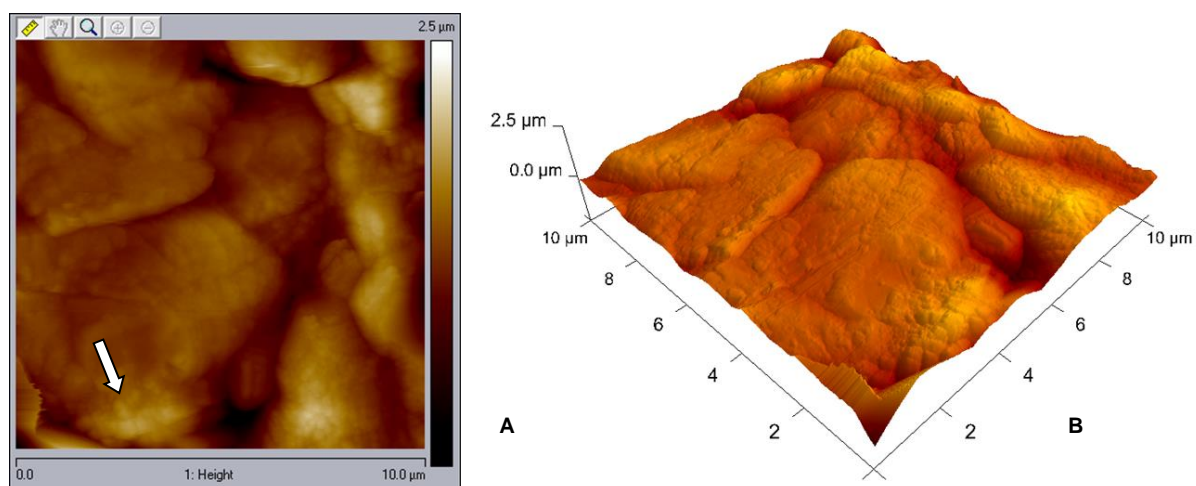
Figura 18 - Microscopia de força atômica da amostra com topografia de superfície em microescala com área de 10 μm x 10 μm



Legenda: Imagens obtidas sob MFA em 2 D (18A) e 3 D (18B) da superfície com topografia em microescala. A seta azul indica uma microestrutura e a branca indica um microporo
Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 19 mostra a MFA da amostra com topografia em nanoescala. Picos arredondados nanotexturizados sobre picos microtexturizados e microporos foram observados na imagem 2 D (Figura 19A). Grandes microestruturas irregulares e nanoestruturas foram vistas na imagem 3 D (Figura 19B).

Figura 19 – Microscopia de força atômica da amostra com topografia de superfície em nanoescala com área de 10 μm x 10 μm



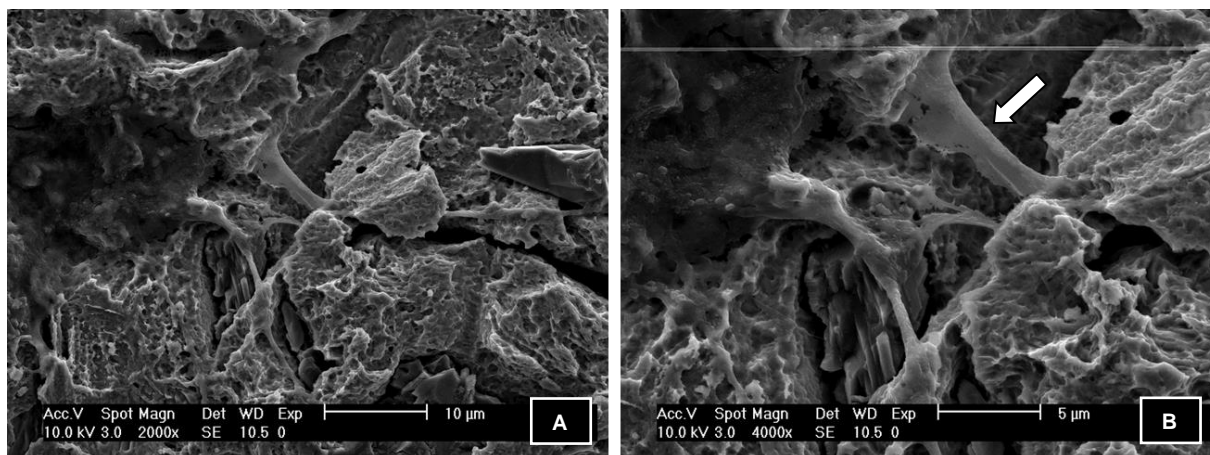
Legenda: Imagens obtidas por MFA em 2 D (19A) e 3 D (19B) da superfície com topografia em nanoescala. A seta indica nanoestruturas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 MEV com células

Discos com células aderidas sobre as superfícies em micro e nanoescala foram analisados por MEV, após 24 horas de cultivo de CTMh. As figuras 20 e 21 mostram as células e seus prolongamentos sobre as superfícies avaliadas.

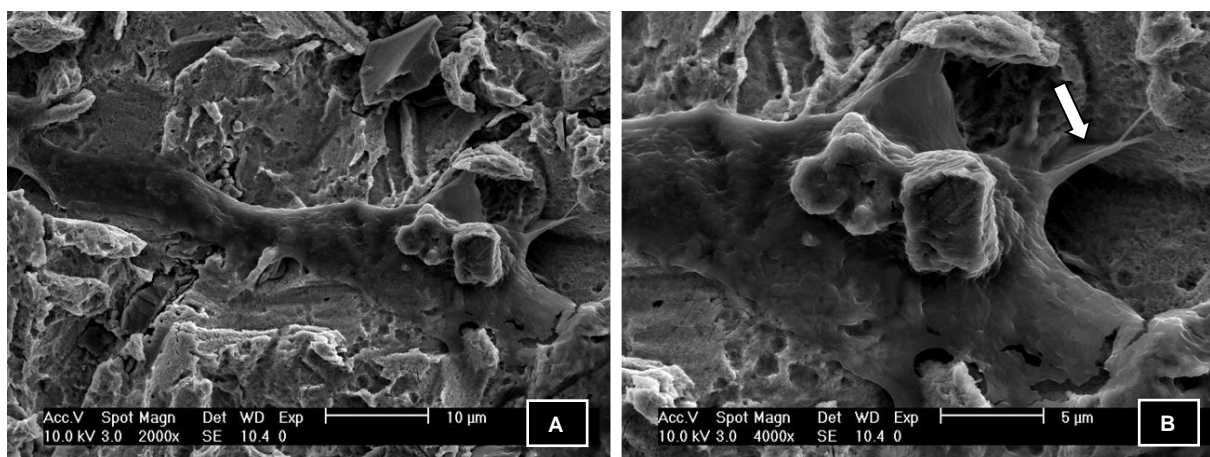
Figura 20 - Células sobre a superfície com topografia em microescala



Legenda: Células e seus prolongamentos em aumentos de A (2000x) e B (4000x) (seta).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 - Células sobre a superfície com topografia em nanoescala



Legenda: Células e seus prolongamentos em aumentos de A (2000x) e B (4000x) (seta).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

Para a avaliação da atividade de ALP sobre as superfícies estudadas, utilizaram-se CTMh e MC3T3-E1 42 sob os meios regular e osteogênico 2 (Ost.2). O teste foi realizado aos 3, 7 e 14 dias.

A tabela 3 mostra os valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em CTMh sob o meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias.

Na figura 22, observa-se maior atividade de ALP em CTMh, sob meio Ost.2 nas amostras com superfícies micro e nanotexturizadas quando comparadas às lisas, após 7 e 14 dias de cultivo das células. Entretanto, não houve diferença estatística entre as amostras nesses períodos.

Aos 7 dias, foi observada maior atividade de ALP em todas as amostras avaliadas. Após 14 dias, observou-se diminuição da atividade de ALP para todas as superfícies, porém, maior atividade foi observada para a superfície nanotexturizada neste período, com diferença estatística com relação amostra lisa ($p=0,001$). Essa diferença, em superfícies diferentes no mesmo período, foi indicada por (*) no gráfico.

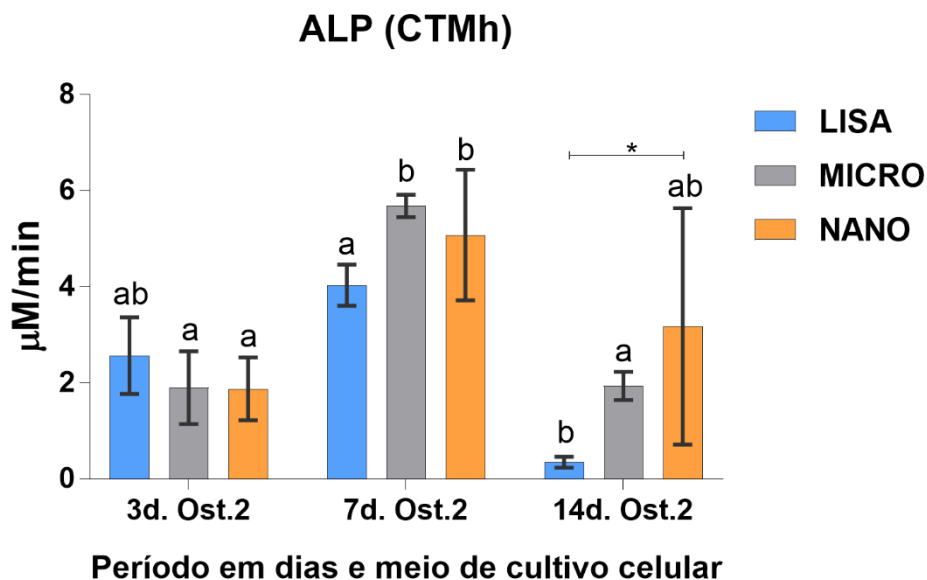
Diferenças estatísticas foram observadas entre os períodos de 7 e 14 dias para a amostra lisa ($p=0,008$). Para a amostra com topografia em microescala, foi observada diferença entre 3 e 7 dias ($p=0,006$) e entre 7 e 14 dias ($p=0,007$). Para a amostra nano, observou-se diferença estatística ($p=0,01$) entre 3 e 7 dias. Essas diferenças, nas mesmas superfícies em períodos distintos, foram indicadas por letras minúsculas no gráfico. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente. Médias seguidas por letras diferentes, indicam diferença estatística entre as mesmas superfícies em períodos distintos (Figura 22).

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em CTMh sob meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície aos 3, 7 e 14 dias

CTMh	LISA		MICRO		NANO	
	Média	DV	Média	DV	Média	DV
3 dias Ost.2	2.56	0.80	1.90	0.76	1.88	0.65
7 dias Ost.2	4.04	0.43	5.68	0.23	5.08	1.36
14 dias Ost.2	0.35	0.11	1.94	0.29	3.18	2.46

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 – Gráfico representativo da atividade de ALP em CTMh sob o meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística entre diferentes amostras no mesmo período. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente. Médias seguidas por letras diferentes, indicam diferença estatística entre as mesmas superfícies em períodos distintos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A tabela 4 mostra os valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em CTMh sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias.

Para as CTMh, sob o meio de cultivo regular, maior atividade de ALP foi observada aos 7 dias para as superfícies micro e nano. Observou-se diferença estatística entre as superfícies lisa e micro ($p=0,04$); entre a lisa e a nano ($p<0,0001$) e entre a micro e a nano ($p=0,01$) (Figura 23).

Diferença estatística também foi observada entre a superfície lisa e micro ($p=0,006$), aos 14 dias. Essas diferenças, em superfícies diferentes no mesmo período, foram indicadas por (*) no gráfico.

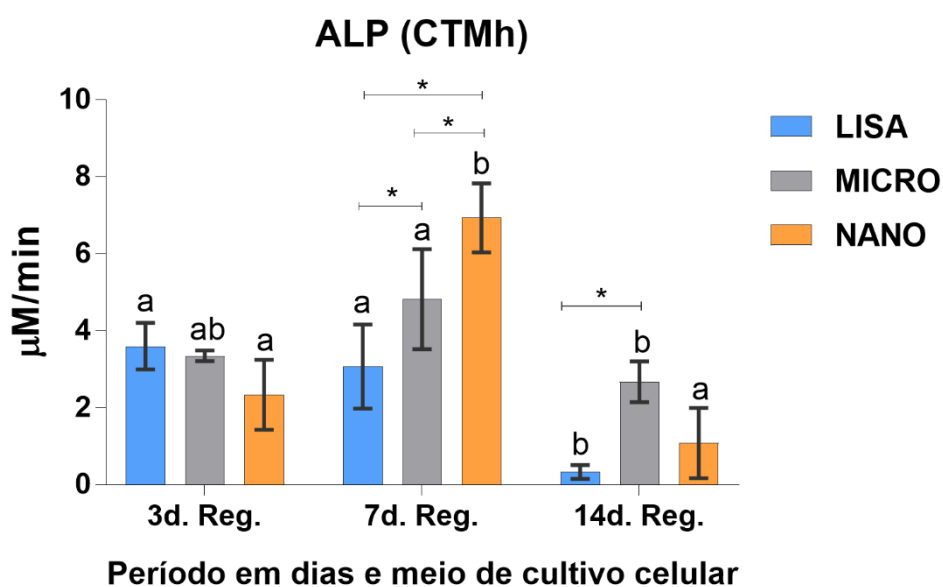
Observou-se diferença estatística na superfície lisa entre 3 e 14 dias ($p=0,001$) e entre 7 e 14 dias ($p=0,006$). Na superfície micro, diferença estatística foi observada entre 7 e 14 dias ($p=0,02$). Para a superfície nano observou-se $p<0,0001$ entre os períodos 3 e 7 dias e 7 e 14 dias. Essas diferenças, nas mesmas superfícies em períodos distintos, foram indicadas por letras minúsculas no gráfico.

Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em CTMh sob meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias

CTMh	LISA		MICRO		NANO	
	Média	DV	Média	DV	Média	DV
3 dias Reg.	3.60	0.61	3.35	0.14	2.34	0.91
7 dias Reg.	3.07	1.09	4.82	1.30	6.93	0.89
14 dias Reg.	0.33	0.18	2.68	0.53	1.08	0.92

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 - Gráfico representativo da atividade de ALP em CTMh sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística entre diferentes amostras no mesmo período. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente. Médias seguidas por letras diferentes, indicam diferença estatística entre as mesmas superfícies em períodos distintos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A tabela 5 mostra os valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em células MC3T3-E1 subclone 42 sob meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias.

Para as células MC3T3-E1 subclone 42, sob meio de cultivo osteogênico 2, observa-se na figura 24, maior atividade de ALP nas amostras com superfícies micro e nanotexturizadas, quando comparadas às lisas após 3, 7 e 14 dias. Diferença estatística foi observada entre as amostras lisa e micro no período de 7 dias ($p=0,03$) e de 14 dias ($p=0,01$). Essas diferenças estatísticas, entre diferentes amostras no mesmo período, foram indicadas por (*) no gráfico (Figura 24).

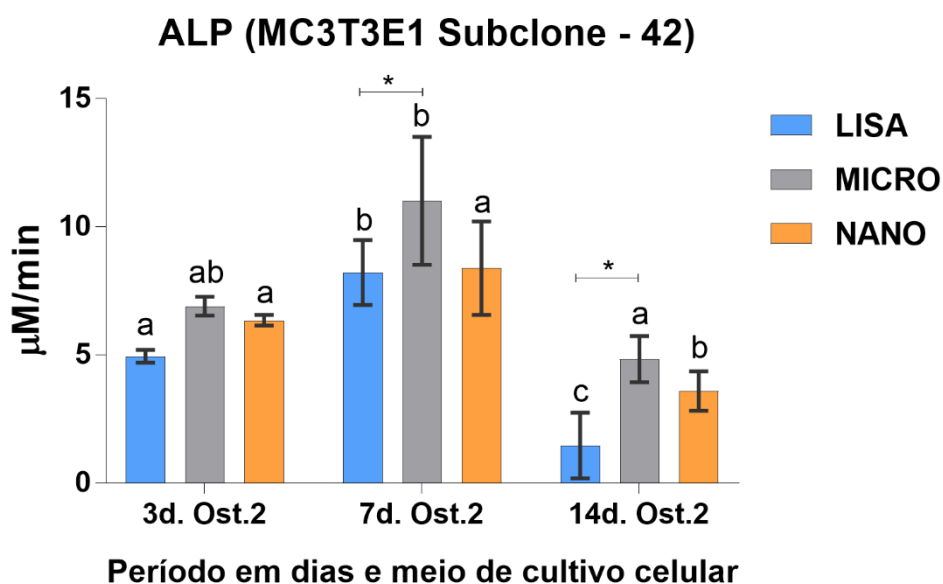
A amostra com topografia lisa apresentou diferença estatística significativa entre os períodos de 3 e 7 dias ($p=0,007$), 3 e 14 dias ($p=0,005$) e 7 e 14 dias ($p<0,0001$). Para a topografia em microescala foi observada diferença estatística significativa entre os períodos de 3 e 7 dias ($p=0,001$) e entre 7 e 14 dias ($p<0,0001$). E a topografia em nanoescala apresentou diferença estatística entre os períodos de 3 e 14 dias ($p=0,02$) e entre 7 e 14 dias ($p=0,004$). Essas diferenças, nas mesmas superfícies em períodos distintos, foram indicadas por letras minúsculas no gráfico.

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em MC3T3-E1 subclone 42 sob meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias

MC3T3-E1 sub. 42	LISA		MICRO		NANO	
	Média	DV	Média	DV	Média	DV
3 dias Ost.2	4.94	0.25	6.90	0.37	6.35	0.21
7 dias Ost.2	8.21	1.27	11.01	2.49	8.38	1.83
14 dias Ost.2	1.46	1.27	4.83	0.90	3.59	0.77

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 - Gráfico representativo de ALP em células MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio Ost.2, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística entre diferentes amostras no mesmo período. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente. Médias seguidas por letras diferentes, indicam diferença estatística entre as mesmas superfícies em períodos distintos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A tabela 6 mostra os valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em MC3T3-E1 subclone 42 sob meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias.

Para as MC3T3-E1 subclone 42, sob meio de cultivo regular, observa-se na figura 25, maior atividade de ALP nas amostras com superfícies micro e nanotexturizadas, quando comparadas às lisas após 3, 7 e 14 dias. Entretanto, não houve diferença estatística entre as amostras.

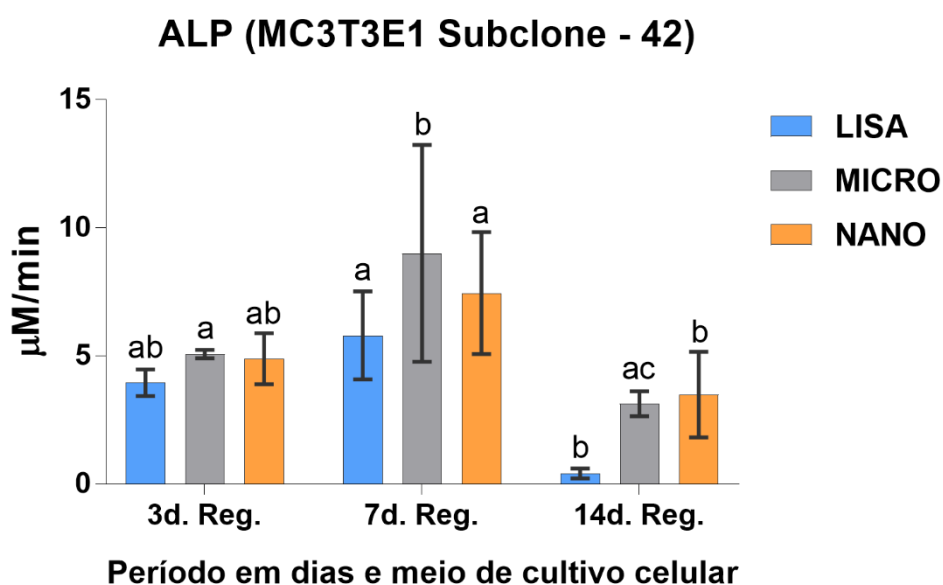
A amostra com topografia lisa apresentou diferença estatística entre 7 e 14 dias ($p=0,006$). A amostra com topografia em microescala apresentou diferença estatística entre os períodos de 3 e 7 dias ($p=0,03$) e entre 7 e 14 dias ($p=0,003$). A amostra com topografia em nanoescala apresentou diferença estatística entre 7 e 14 dias ($p=0,03$). Essas diferenças, nas mesmas superfícies em períodos distintos, foram indicadas por letras minúsculas no gráfico (Figura 25).

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão obtidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ de ALP em MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias

MC3T3-E1 sub. 42	LISA		MICRO		NANO	
	Média	DV	Média	DV	Média	DV
3 dias Reg.	3.95	0.52	5.06	0.16	4.88	1.00
7 dias Reg.	5.80	1.72	9.00	4.23	7.45	2.38
14 dias Reg.	0.41	0.19	3.13	0.49	3.49	1.67

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25 - Gráfico representativo da atividade de ALP em células MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 3, 7 e 14 dias



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente. Médias seguidas por letras diferentes, indicam diferença estatística entre as mesmas superfícies em períodos distintos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 Unidades formadoras de colônias de osteoblastos por meio da atividade da fosfatase alcalina (UFC-Ob)

Após o cultivo de CTMc, sob meio regular por 14 dias, observou-se na análise de UFC-Ob, maior quantidade de colônias nas superfícies micro e nanotexturizadas, quando comparadas à superfície lisa e ao controle. A tabela 7 mostra os valores médios e desvio padrão obtidos em UFC-Ob em CTMc sob meio regular, após 14 dias.

Foi observada diferença estatística significativa, após análise de variância (ANOVA). Um fator, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$) entre as superfícies lisa e com topografia em microescala ($p = 0,004$) (Figura 26).

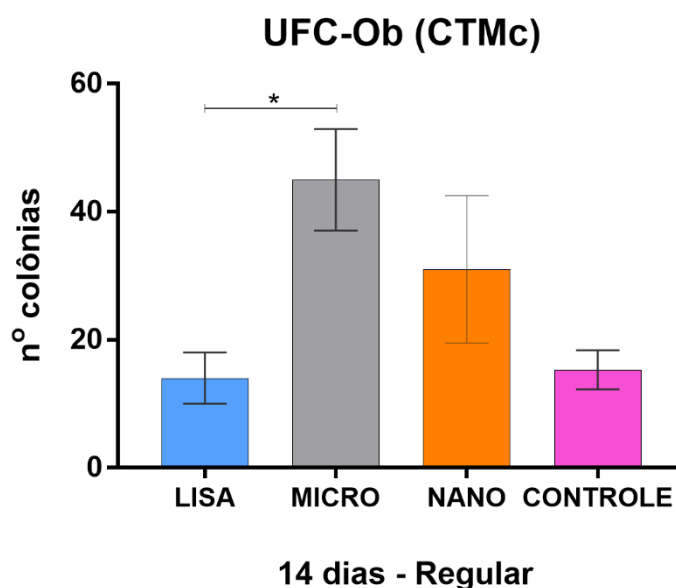
Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão obtidos para UFC-Ob em CTMc sob meio regular, aos 14 dias

CTMc	LISA		MICRO		NANO	
	Média	DV	Média	DV	Média	DV
14 dias Reg.	14.00	4.00	45.00	7.94	31.00	11.53

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se na figura 26, um gráfico representativo do número médio de UFC-Ob obtido em CTMc sob meio regular, após 14 dias nas superfícies estudadas e no grupo controle (poços apenas com células, sem discos).

Figura 26 – Gráfico representativo do número médio de UFC-Ob em CTMc sobre as superfícies estudadas e no grupo controle, após 14 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística entre diferentes amostras no mesmo período.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9 Análise de mineralização (deposição de cálcio)

A superfície nanotexturizada apresentou maior deposição de cálcio sobre os discos em CTMh e em células MC3T3-E1 subclone 42, após 28 dias.

A tabela 8 mostra os valores médios e desvio padrão obtidos em O.D da deposição de cálcio em CTMh sob meio osteogênico 1, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias.

Após a análise da deposição de cálcio em CTMh, sob o meio de cultivo osteogênico 1 nas diferentes superfícies estudadas, observou-se maior produção de cálcio na superfície em nanoescala, nos dois períodos avaliados. Diferença estatística foi observada entre as superfícies micro e nano ($p=0,005$), no período de 28 dias. Essas diferenças estatísticas, entre diferentes amostras no mesmo período, foram indicadas por (*) no gráfico (Figura 27).

A amostra com topografia lisa e em nanoescala apresentaram diferença estatística entre os períodos avaliados ($p=0,02$ e $p=0,002$), respectivamente. Essas

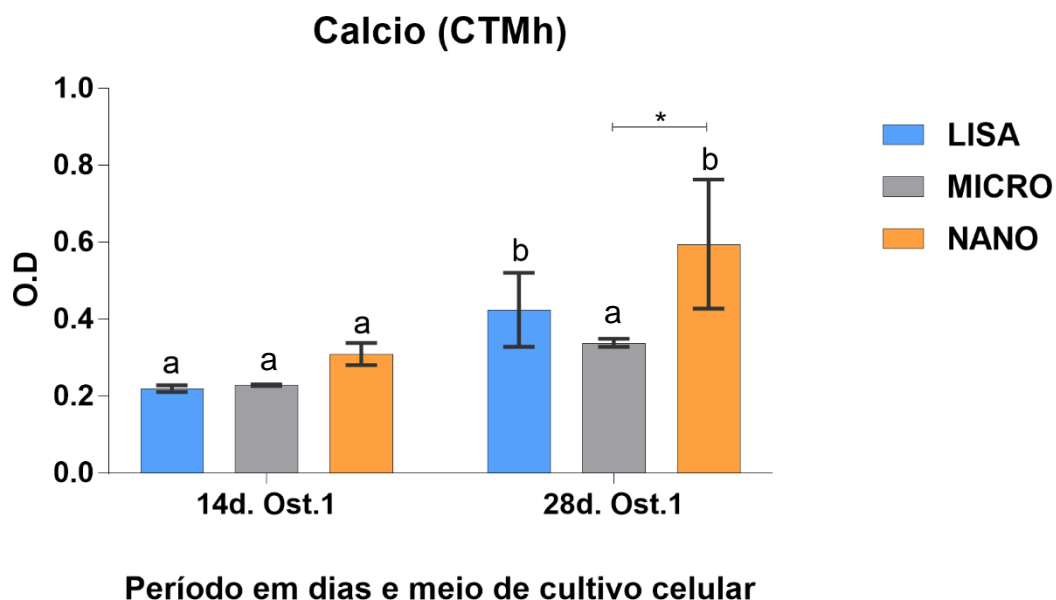
diferenças, nas mesmas superfícies em períodos distintos, foram indicadas por letras minúsculas no gráfico.

Tabela 8 - Valores médios e desvio padrão obtidos em O.D da deposição de cálcio em CTMh sob meio osteogênico 1, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias

CTMh	LISA		MICRO		NANO	
	Média	DV	Média	DV	Média	DV
14 dias Ost.1	0.22	3.00	0.23	0.00	0.31	0.03
28 dias Ost.1	0.43	3.00	0.34	0.01	0.60	0.17

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27 - Gráfico representativo da deposição de cálcio em CTMh sob o meio osteogênico 1 nas diferentes topografias de superfície, após 14 e 28 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística entre diferentes amostras no mesmo período. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente. Médias seguidas por letras diferentes, indicam diferença estatística entre as mesmas superfícies em períodos distintos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A tabela 9 mostra os valores médios e desvio padrão obtidos em O.D da deposição de cálcio em MC3T3-E1 subclone 42, sob o meio de cultivo osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias.

Após a análise da deposição de cálcio em células MC3T3-E1 subclone 42, sob o meio de cultivo osteogênico 2 nas diferentes superfícies estudadas, observou-se maior produção na superfície em nanoescala, após 28 dias (Figura 28).

Diferença estatística foi observada entre as superfícies lisa e nano ($p=0,002$) e as superfícies micro e nano ($p=0,003$), no período de 28 dias. Diferenças estatísticas, entre diferentes amostras no mesmo período, foram indicadas por (*) no gráfico (Figura 29).

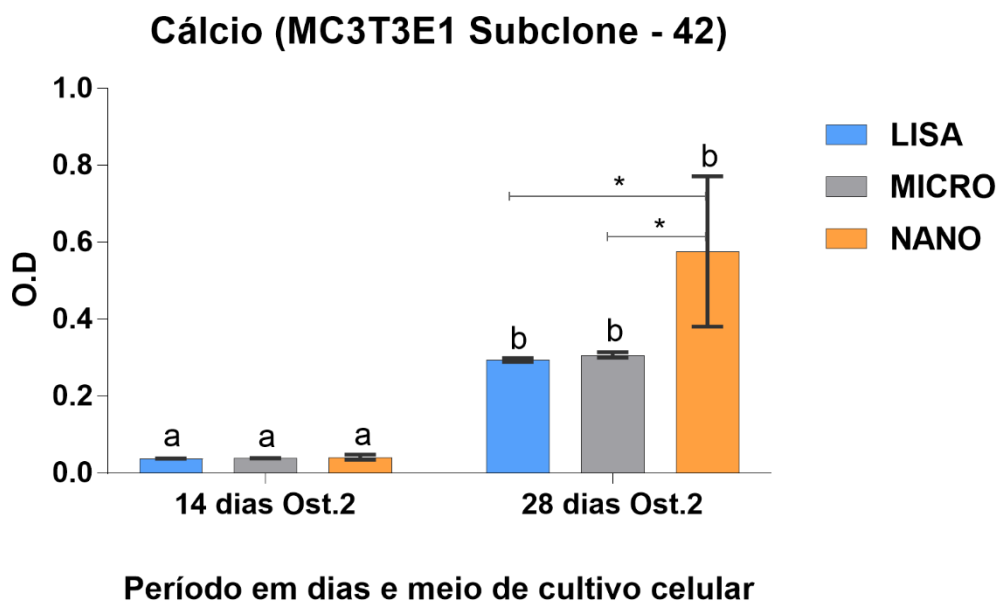
As amostras com topografia lisa, em microescala e em nanoescala apresentaram diferença estatística entre os períodos avaliados ($p=0,006$; $p=0,004$ e $p<0,0001$), respectivamente. Essas diferenças, nas mesmas superfícies em períodos distintos, foram indicadas por letras minúsculas no gráfico (Figura 28).

Tabela 9 – Valores médios e desvio padrão (DV) obtidos em O.D da deposição de cálcio em MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias

MC3T3-E1 sub. 42	LISA		MICRO		NANO	
	Média	DV	Média	DV	Média	DV
14 dias Ost.2	0.04	0.00	0.04	0.00	0.04	0.01
28 dias Ost.2	0.29	0.01	0.31	0.01	0.58	0.20

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28 - Gráfico representativo da deposição de cálcio em células MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio osteogênico 2, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística entre diferentes amostras no mesmo período. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente. Médias seguidas por letras diferentes, indicam diferença estatística entre as mesmas superfícies em períodos distintos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A tabela 10 mostra os valores médios e desvio padrão obtidos em O.D da deposição de cálcio em MC3T3-E1 subclone 42, sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias.

Após a análise da deposição de cálcio em MC3T3-E1 subclone 42, sob o meio de cultivo regular, observou-se maior produção na superfície em nanoescala entre as diferentes superfícies estudadas, após 28 dias (Figura 29).

Observou-se diferença estatística entre as superfícies lisa e nano ($p=0,0004$) e entre as superfícies micro e nano ($p=0,003$), no período de 28 dias. Diferenças estatísticas, entre diferentes amostras no mesmo período, foram indicadas por (*) no gráfico (Figura 29).

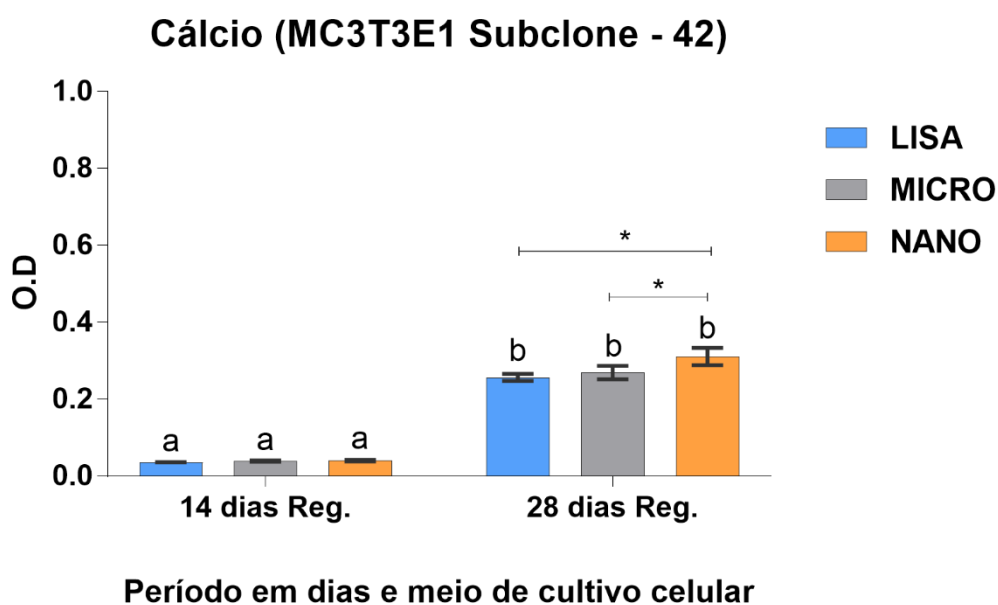
As topografias lisa, em microescala e em nanoescala apresentaram diferença estatística entre os períodos avaliados, com $p<0,0001$. Diferenças, nas mesmas superfícies em períodos distintos, foram indicadas por letras minúsculas no gráfico (Figura 30).

Tabela 10 - Valores médios e desvio padrão (DV) obtidos em O.D da deposição de cálcio em MC3T3-E1 subclone 42, sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias

MC3T3-E1 sub 42	LISA		MICRO		NANO	
	Média	DV	Média	DV	Média	DV
14 dias Reg.	0.04	0.00	0.04	0.00	0.04	0.00
28 dias Reg.	0.26	0.01	0.27	0.02	0.31	0.02

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 - Gráfico representativo da deposição de cálcio em células MC3T3-E1 subclone 42 sob o meio regular, nas diferentes topografias de superfície após 14 e 28 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística entre diferentes amostras no mesmo período. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente. Médias seguidas por letras diferentes, indicam diferença estatística entre as mesmas superfícies em períodos distintos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10 Ensaio bioluminescente de luciferase com plasmídeo do gene *Col5a3*

A atividade relativa da luciferase relacionada à expressão do *Col5a3* foi avaliada em MC3T3E1 subclone 14, sob os meios regular e Ost.2, após 48 horas da transfecção das células.

A tabela 11 mostra os valores médios e desvio padrão obtidos da expressão do *Col5a3* em MC3T3-E1 subclone 14, sob os meios regular e Ost.2, nas diferentes topografias de superfície, após 48 horas.

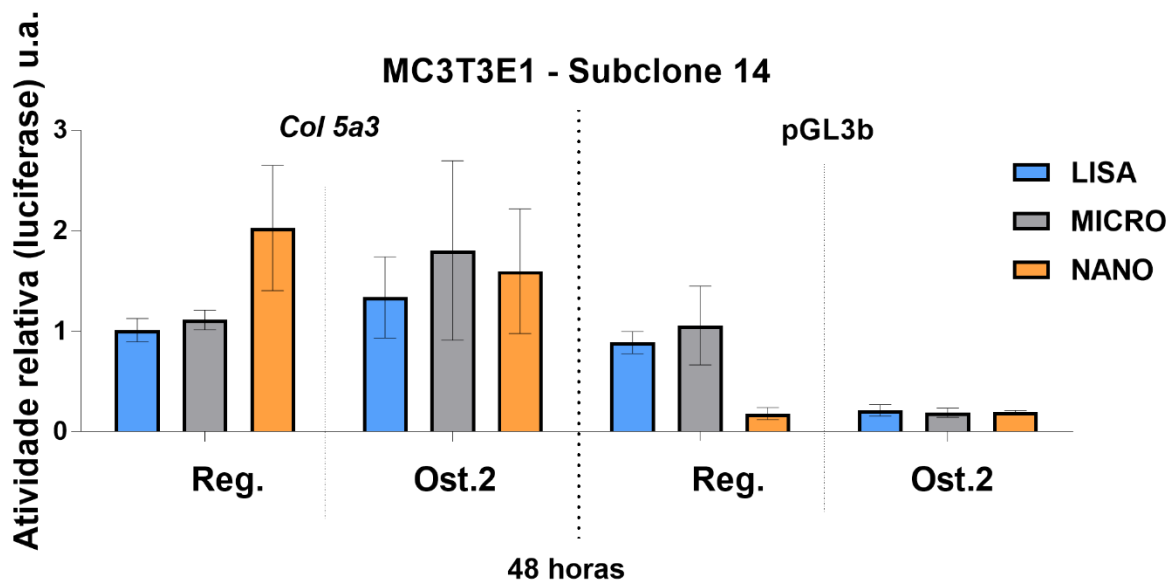
Observou-se maior atividade da luciferase nas células sobre a superfície nanotexturizada com meio de cultivo regular e maior atividade na superfície microtexturizada, em meio Ost.2, após 48 horas. Entretanto, não foi observada diferença estatística entre as superfícies após análise de variância (ANOVA) Dois fatores ($p > 0,05$) (Figura 30).

Tabela 11 - Valores médios e desvio padrão (DV) obtidos em u.a da expressão do *Col5a3* em MC3T3-E1 subclone 14, sob os meios regular e Ost.2, nas diferentes topografias de superfície, após 48 horas

MC3T3-E1 sub. 14	LISA		MICRO		NANO	
	Média	DV	Média	DV	Média	DV
48 horas Reg.	1.01	0.11	1.11	0.09	2.02	0.62
48 horas Ost.2.	1.33	0.40	1.80	0.69	1.59	0.81

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 – Gráfico representativo da atividade relativa da luciferase relacionada ao *Col 5a3* em células MC3T3-E1 subclone 14 sob os meios regular e Ost.2 nas diferentes topografias de superfície, após 48 horas



Legenda: pGL3b: controle interno da reação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.11 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)

Avaliou-se a expressão dos genes (*Alp*, *Bmp2*, *Ibsp*, *Prrx1*, *Runx2*, *Satb2*, *Sp7*) em MC3T3-E1 subclone 42 sob os meios de cultivo regular e ost. 2, após 7 dias. Os dados foram descritos a partir dos valores em *fold change* obtidos do cultivo das células sobre a superfície das amostras estudadas, comparados à superfície lisa que foi utilizada como grupo controle.

Em *fold change* os valores maiores ou menores do que 1 indicam maior expressão ou menor expressão gênica em relação ao grupo controle (expressão = 1).

Sob o meio de cultivo Ost.2, a expressão de importantes fatores de transcrição para diferenciação osteoblástica como *Runx2* e *Satb2*, apresentaram-se maiores nas células sobre a superfície nanotexturizada quando comparadas ao grupo controle (superfície lisa). O mesmo não foi observado para a superfície microtexturizada, que apresentou menor expressão gênica de todos os fatores de transcrição estudados (*Runx2*, *Sp7*, *Satb2* e *Prrx1*) do que o grupo controle (Figura 31).

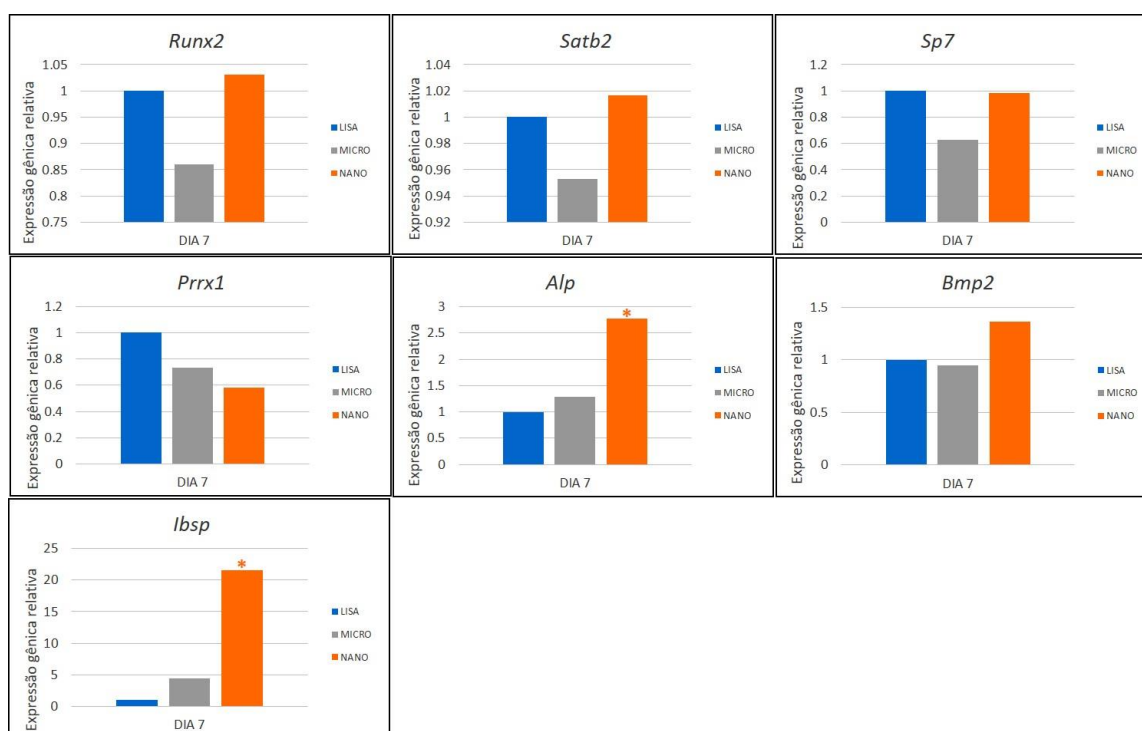
O osterix (*Sp7*) e o *Prrx1* apresentaram-se menos expressos na superfície nanotexturizada em relação ao controle.

Observou-se 2,7 vezes maior expressão de *Alp* na superfície nano ($p=0,01$) e na microtexturizada ($p>0,05$), comparadas ao controle. A *Bmp2* apresentou-se mais expressa na superfície nano e menos expressa na microtexturizada, quando comparadas ao controle.

Maior expressão de *Ibsp* foi observada nas superfícies nano ($p=0,002$) e microtexturizadas ($p>0,05$) quando comparadas ao controle.

A figura 31 mostra os gráficos representativos da expressão dos genes avaliados no estudo, em MC3T3E1 subclone 42, após 7 dias de cultivo em meio Ost.2.

Figura 31- Gráficos representativos da expressão dos genes *Runx2*, *Satb2*, *Sp7*, *Prrx1*, *Alp*, *Bmp2* e *Ibsp* em MC3T3E1 subclone 42, sob meio Ost.2, após 7 dias



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os mesmos genes também foram avaliados em MC3T3-E1 subclone 42 sob meio de cultivo regular, após 7 dias. A superfície lisa foi utilizada como controle para análise da expressão gênica relativa.

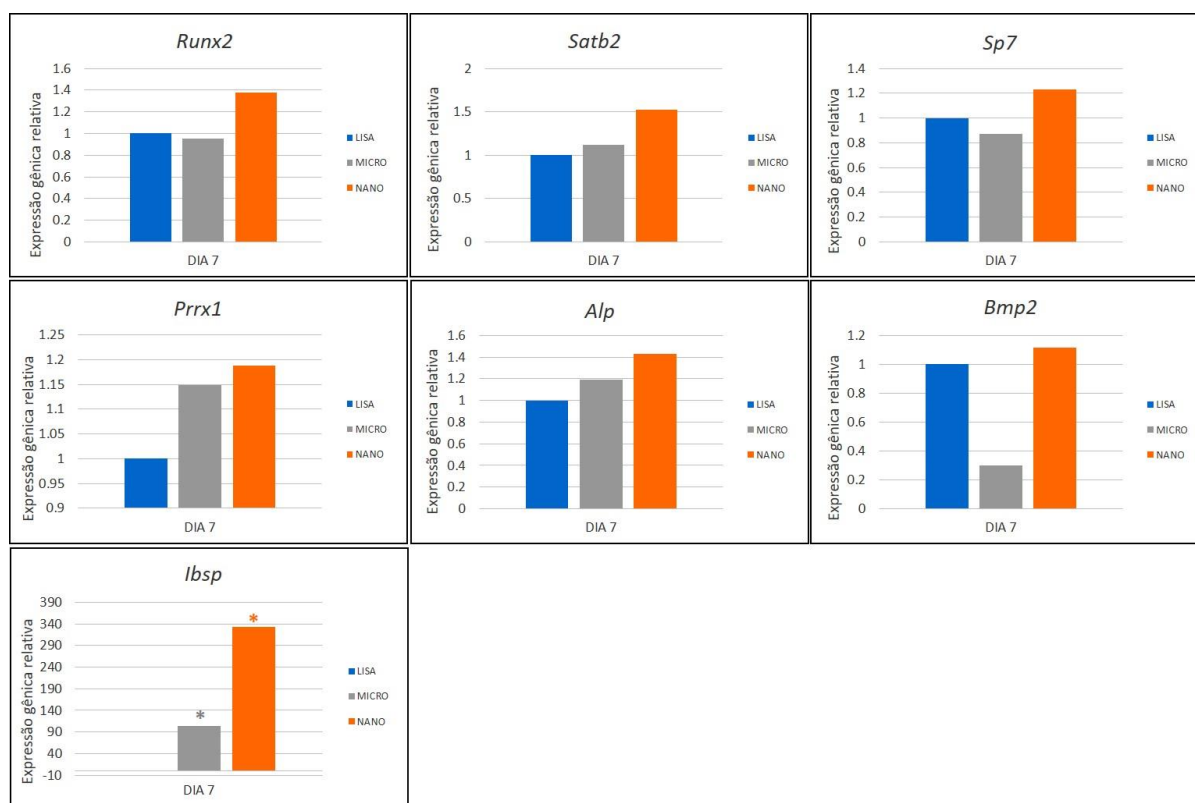
A expressão dos fatores de transcrição (*Runx2*, *Sp7* e *Satb2*) foi maior na superfície nano e menor na microtexturizada, quando comparados ao grupo controle.

Apenas o *Satb2* se apresentou mais expresso na superfície microtexturizada em relação ao controle.

Os genes *Prrx1* e *Alp* apresentaram-se mais expressos nas superfícies micro e nanotexturizadas ($p > 0,05$). O *Bmp2* apresentou-se mais expresso somente na superfície nanotexturizada e o gene *Ibsp* apresentou maior expressão nas superfícies micro e nanotexturizadas, com diferenças estatísticas para ambas as superfícies ($p = 0,0003$ micro e $p = 0,008$ nano), quando comparados ao grupo controle.

A figura 32 mostra os gráficos representativos da expressão dos genes avaliados no estudo, em MC3T3E1 subclone 42, após 7 dias de cultivo em meio regular.

Figura 32 - Gráficos representativos da expressão dos genes *Runx2*, *Satb2*, *Sp7*, *Prrx1*, *Alp*, *Bmp2* e *Ibsp* em MC3T3E1 subclone 42, em meio regular, após 7 dias



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

A micro e a nanotopografia podem influenciar a proliferação, diferenciação e adesão celular, favorecendo a osteogênese. Superfícies que mimetizam características do tecido ósseo inato melhoram a maturação osteoblástica, aumentam o contato entre o osso e o implante e seu índice de sucesso. O impacto de características como a rugosidade, composição química e molhabilidade das superfícies tem sido demonstrado já no início do processo de remodelação óssea, bem como na osseointegração alcançada a longo prazo (Mendonça G et al., 2008; Gittens et al., 2014a; Ogle, 2015).

Propriedades da superfície como a morfologia, rugosidade, espessura e tipo de óxido da camada e nível de impureza dependem do processo de tratamento da superfície do implante. A dificuldade de analisar a influência desses parâmetros individualmente vem da impossibilidade de alterar somente um parâmetro sem alterar os outros, visto que não é viável alterar o tipo ou a composição química e a estrutura cristalina do óxido do titânio e manter a rugosidade inalterada (Elias, Meirelles, 2010).

Excelentes propriedades químicas e mecânicas são encontradas no TiCp grau IV, com apenas 1% de impurezas como o ferro e oxigênio (Ehrenfest et al., 2010). Os tratamentos de superfícies utilizados no presente estudo (Quadro 1) criaram topografias de superfícies lisa, micro e nanotexturizada, como demonstrado nas análises de MEV, perfilometria óptica e MFA. Além disso, na DRX foram identificados picos das fases cristalinas de titânio- α , rutilo e anatase da camada de TiO_2 do titânio, indicando diferença na estrutura cristalina entre as amostras.

A camada de TiO_2 pode ser encontrada na fase amorfa do titânio ou em diferentes índices nas fases cristalinas anatase, rutilo e bruquita. A rutilo é a forma mais comum e estável, porém a estrutura e a composição do cristal podem ser modulados por apropriados tratamentos de superfícies (Variola et al., 2008; Ehrenfest et al., 2010). O TiO_2 amorfo pode ser convertido a anatase ou rutilo, sob condições de aquecimento, tempo de exposição química em ácidos, entre outras (Variola et al., 2008; Gaintantzopoulou et al., 2014).

Nesse estudo, foi possível identificar a estrutura cristalina da superfície das amostras por DRX. Observou-se as fases α do titânio, rutilo e anatase nas amostras

em micro e nanoescala. Na amostra em microescala foi possível identificar também a fase de TiH_2 . A DRX nas configurações utilizadas nesse estudo, não foi capaz de identificar a fina camada de TiO_2 presente na superfície lisa e, em quaisquer peças de titânio, quando em contato com o ar (Zhu X et al., 2004; Gaintantzopoulou et al., 2014). Por outro lado, nas superfícies micro e nanotexturizadas, um aumento na espessura da camada de TiO_2 foi obtido após os tratamentos de superfícies, possibilitando a identificação das fases descritas anteriormente.

Variola et al. (2008) utilizaram solução piranha em TiCP grau V ($Ti6Al4V$), esses autores não identificaram as fases anatase e rutilo em suas amostras por DRX, sugerindo que a camada de TiO_2 obtida após o tratamento de superfície era composta principalmente de TiO_2 amorfo. Os autores utilizaram o ácido mais concentrado (37N H_2SO_4) e por um tempo de exposição menor (4 horas) do que o utilizado nesse estudo. Esses dados mostram que a solução piranha em diferentes concentrações e em diferentes tempos de exposição, alteraram a estrutura cristalina da camada de TiO_2 , após diferentes tratamentos de superfícies, de acordo com a literatura (Variola et al., 2008; Gaintantzopoulou et al., 2014).

Embora com morfologias diferentes, as superfícies jateadas e tratadas com ácidos, exibem predominantemente a fase cristalina rutilo. Por outro lado, as superfícies anodizadas, exibem a anatase (Elias, Meirelles, 2010). Pode-se observar ambas as fases nas superfícies micro e nanotexturizadas, criadas por jateamento e condicionamento ácido e/ou solução piranha, desse estudo.

Durante o condicionamento ácido, íons H^+ são lançados e rapidamente absorvidos pelo material, formando o TiH_2 . Acima da concentração tolerada (150 ppm), hidretos precipitam dentro do titânio causando fadiga nas propriedades mecânicas do material (Szmukler-Moncler et al., 2010). Com a DRX nas configurações utilizadas nesse estudo, não foi possível verificar a quantidade de TiH_2 presente na amostra em microescala. Lin et al. (2014) também identificaram picos de TiH_2 por DRX em TiCp grau IV tratados com a combinação de HCl/H_2SO_4 . Os autores avaliaram as amostras sob diferentes condições de tempo e temperatura e mostraram que o TiH_2 apresentou uma relação tempo-dependente.

A presença de TiH_2 poderia interferir na adesão, proliferação e diferenciação osteogênica. Entretanto, o TiH_2 poderia estar recoberto pela camada protetora de TiO_2 e não apresentar qualquer influência nesse processo. Existe, ainda, a possibilidade

de que a presença de TiH_2 , mesmo depois de recoberta pela camada de TiO_2 , continue absorvendo hidrogênio dos fluidos biológicos, podendo causar dor e inflamação (Lin et al., 2014). Mais estudos são necessários para esclarecer a influência do TiH_2 na diferenciação osteogênica.

Os fenômenos de atividade fotocatalítica e super-hidrofilicidade presentes na anatase permitem sua utilização em diversas aplicações como esterilização, auto-limpeza, purificação de água e ar, entre outros. Essas características poderiam ser úteis na prevenção da adesão bacteriana na superfície de implantes (Lorenzetti et al., 2014). A anatase foi identificada nas amostras micro e nanotexturizadas nesse estudo.

A espessura e o dinamismo da camada de TiO_2 são diretamente relacionados com a composição química da superfície e com a osseointegração. Implantes com camadas mais espessas de TiO_2 apresentam maior atividade osteoindutiva na medida em que aumentam a formação de matriz mineralizada (Ehrenfest et al., 2010). As propriedades de cicatrização, osseointegração e descontaminação de superfícies expostas, têm sido destacadas por proporcionarem um efeito sinérgico à ampla variedade de tratamentos de superfície utilizados (Gaintantzopoulou et al., 2014).

Embora o papel biológico fundamental do TiO_2 na osseointegração venha atraindo grande interesse, há informações limitadas sobre a estrutura dessa camada. Parâmetros estruturais que podem ser identificados com a DRX como a orientação principal do cristal e sua proporção nas variadas fases cristalinas, quase nunca são avaliados nos implantes disponíveis comercialmente (Ehrenfest et al., 2010; Elias, Meirelles, 2010; Gaintantzopoulou et al., 2014).

Estratégias de modificações químicas e físicas nas superfícies dos implantes são utilizadas com o objetivo de acelerar o processo de reparo e aumentar a formação óssea na interface, por influenciar interações biomoleculares e iônicas, e alterar a energia e a molhabilidade de superfície. Estas propriedades determinam de forma ainda não totalmente elucidada a cascata de eventos biológicos que ocorre entre a superfície do biomaterial e o hospedeiro. Apresentam influência direta na adsorção de proteínas, evento de extrema importância que precede a interação das células com a superfície do biomaterial (Gittens et al., 2014b; Rupp et al., 2014). Quanto maior a nanotexturização, maior a energia de superfície e a molhabilidade do biomaterial (Ehrenfest et al., 2010).

Estudos têm mostrado maior diferenciação osteoblástica e mineralização óssea em superfícies hidrofílicas quando comparadas às hidrofóbicas. A expressão de colágeno e osteoprotegerina, são maiores em superfícies hidrofílicas. Estudos *in vivo* mostraram maior contato osso-implante em superfícies hidrofílicas do que em hidrofóbicas, após 2 e 4 semanas. Além disso, a topografia e a molhabilidade da superfície podem apresentar um efeito sinérgico no comportamento celular (Elias, Meirelles, 2010; Gittens et al., 2014b).

Resultados de AC obtidos para as amostras desse estudo demonstraram a hidrofiliabilidade das superfícies estudadas ($AC < 90^\circ$). As superfícies com topografia lisa e em nanoescala mostraram valores médios de AC semelhantes (65°) entre si, enquanto que a superfície microtexturizada apresentou valor de AC de 82° . Após tratamentos com a utilização de ácidos, as superfícies podem apresentar configuração líquido repelente. Nesse caso, no interior dos poros criados pelo tratamento ácido, o ar pode ficar aprisionado impedindo uma adsorção normal de proteínas. Dessa forma, o AC obtido é maior (Rupp et al., 2004). Esse efeito pode ter ocorrido nas amostras em micro e em nanoescala no presente estudo, devido à grande rugosidade criada nas superfícies após os tratamentos.

Lin et al. (2014) obtiveram valores de AC menores em amostras de TiCP grau IV tratadas com a combinação de HCl/H₂SO₄, em diferentes períodos, indicando uma relação tempo-dependente. No presente estudo, avaliou-se a molhabilidade da superfície das amostras em apenas um momento, impedindo uma análise tempo-dependente.

A molhabilidade da superfície é diretamente relacionada com a sua topografia. Valores médios de AC obtidos em superfícies tratadas com ácidos (de 117° a $<90^\circ$) e dados de AC fornecidos comercialmente, apresentam grande variação. Além disso, pouco se sabe das características de molhabilidade intrínseca do tecido ósseo e qual a melhor forma de mimetizá-la (Gittens et al., 2014b). No entanto, estudos de caracterização de biomaterias não têm grande enfoque somente na molhabilidade. Por isso, a caracterização detalhada da topografia da superfície é recomendada para discutir efeitos de hidrofiliabilidade possivelmente obtidos. Segundo Rupp et al. (2004), depois de entrar novamente em contato com a água, as superfícies hidrofóbicas pós condicionamento ácido, recuperam sua hidrofiliabilidade.

A rugosidade da superfície apresenta importante papel na osseointegração, por promover maior contato entre o osso e os implantes (Ogle, 2015). A combinação de análises quantitativas e qualitativas fornece a caracterização da rugosidade superficial. Utilizaram-se nesse estudo, ferramentas de análise das superfícies como perfilometria óptica e as microscopias de força atômica (MFA) e eletrônica de varredura (MEV).

A análise por perfilometria óptica fornece dados quantitativos (R_a e A_a) e imagens bi e tridimensionais obtidas dos perfis da área selecionada, registrados por uma distribuição de alturas (picos e vales) da superfície em micrometros. A principal vantagem dessa técnica é a análise de maiores e mais representativas áreas superficiais do que por outros métodos, como a MFA. Chai et al. (2012) avaliaram a 4 tipos de topografia de superfície de titânio (polidas, usinadas, jateadas e anodizadas). Os autores verificaram que a maior variação de R_t foi encontrada na superfície jateada com 70 μm de alumina, com valor de 18,09 μm . Uma marca comercial alemã que utiliza partículas de alumina, numa variação de 25 a 50 μm , para jateamento e posterior condicionamento com $\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$, encontrou valor de R_t de 10,53 μm (Elias, Meirelles, 2010). Obteve-se, para a superfície nanotexturizada nesse estudo, valor superior de R_t (30,7 μm), o que poderia favorecer o potencial osteogênico.

Superfícies com valores de R_a acima de 2 μm são consideradas rugosas (Albrektsson, Wennerberg, 2004). Rosa MB et al. (2013) avaliaram a topografia de superfícies dos implantes comercialmente disponíveis mais utilizados no Brasil. Os autores encontraram valores de rugosidade moderada (entre 1 e 2 μm) para os implantes avaliados. Os melhores valores de R_a obtidos para o grupo de implantes jateados seguidos de condicionamento ácido foi de 1,53 μm ; para os implantes tratados apenas por condicionamento ácido foi de 1,01 μm e para os anodizados foi de 1,26 μm . Observou-se, no presente estudo, valores de R_a de 2,29 μm para a superfície microtexturizada e 2,75 μm para a nanotexturizada, demonstrando a alta rugosidade das superfícies.

Análises sob MFA fornecem informações em resolução próxima à atômica, oferecem medidas de R_a e permitem análises em meio líquido. É possível a obtenção de imagens em aumentos maiores do que os obtidos por microscópios eletrônicos e com a vantagem de se obter a mesma resolução em três dimensões. Comparada ao MEV sua principal vantagem é não requerer preparos específicos previamente às

análises. Sob superfícies microrugosas, a análise por MFA pode prejudicar a confiabilidade do resultado, devido a interferência no movimento vertical piezoelétrico da ponta contra a superfície (Liu, Webster, 2007; Ehrenfest et al., 2010).

Mendonça G et al. (2010) encontraram diferença estatística nos valores de Ra obtidos por MFA na superfície jateada com 100 µm de alumina e na superfície nanotexturizada, comparadas com a lisa. Assim como no presente estudo, os autores identificaram nanoestruturas sob MFA, na superfície nanotexturizada criada pela solução piranha, nas mesmas concentrações, porém, por um período de tempo menor (2 horas).

A MEV é o padrão ouro para caracterização morfológica em microescala. Para análise e caracterização de nanotopografias e nanoestruturas, a MEV com emissão de campo é utilizada (Ehrenfest et al., 2010). Andrade et al. (2015) observaram poros interconectos em TiCP e em Ti35Nb, obtidos pela técnica da metalurgia do pó, variando de 138 a 150 µm. Observou-se nas amostras micro e nanotexturizadas poros de tamanhos variados, nesse estudo. Na superfície em microescala, obteve-se tamanho de poros variando de 62 a 137 µm, em área aleatória. Consideráveis diferenças nas nanocaracterísticas obtidas por solução piranha utilizando 2N de H₂SO₄ ao invés de 37N foram vistas em estudos anteriores por Mendonça G et al. (2010).

É difícil determinar o tamanho e a configuração ideal das nanoestruturas para as superfícies de implantes dentários, mas estudos indicam que a presença de nanoestruturas por si só pode melhorar a formação óssea. Acredita-se que isso se deva ao fato das nanoestruturas mimetizarem o colágeno do tipo I e os cristais de hidroxiapatita, principais constituintes da matriz extracelular óssea (Elias, Meirelles, 2010). Especificamente, partículas de alumina com tamanhos entre 49 e 67 nm e partículas de titânia entre 32 e 56 nm promovem maior adesão osteoblástica comparadas com seus respectivos materiais em microescala. Observou-se aumento de três vezes na taxa de adesão osteoblástica da alumina convencional com relação à nanoparticulada (Liu, Webster, 2007).

Os nanomateriais exercem claramente grande influência no início da resposta celular, porém, ainda requerem muitos testes antes de seu completo potencial ser elucidado. Ferramentas e técnicas de análises para a caracterização dos benefícios desses materiais foram discutidos. Sugere-se que a criação de ferramentas de alta

resolução, que requerem fácil preparo de amostras para análises e monitoramento das interações biológicas com os nanomateriais, possam agregar grande valor ao conhecimento e avanço nessa área (Liu, Webster, 2007). Entender os mecanismos que fazem com que as células se adaptem sob variados tipos de topografias, é fundamental para o desenvolvimento de superfícies de biomateriais osteoindutivas que promovam resposta biológica desejável (Jemat et al., 2015).

A diferenciação osteoblástica é fortemente influenciada pela microtopografia, mas pode também ser melhorada sinergicamente e indistintamente por características como a nanotopografia e a hidrofiliabilidade (Gittens et al., 2014a; Gittens et al., 2014b). Células cultivadas em superfícies rugosas de titânio possuem alto potencial de diferenciação osteoblástica, expresso por marcadores como ALP, osteocalcina, TGF β -1, colágeno e prostaglandinas (Elias, Meirelles, 2010).

Protocolos de diferenciação osteogênica que usam dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato são frequentemente utilizados em estudos com CTM. A combinação desses indutores de diferenciação osteogênica regula mecanismos que induzem a mineralização. A dexametasona está relacionada à regulação da expressão de *Runx2*, mas achados conflitantes com relação ao seu papel têm sido encontrados. O ácido ascórbico facilita a diferenciação osteogênica por aumentar a secreção de colágeno tipo I dentro da matriz extracelular. O β -glicerofosfato serve como fonte orgânica de fosfato para a mineralização, além de induzir a expressão de genes osteogênicos (Langenbach, Handschel, 2013).

A ALP marca a diferenciação da linhagem osteoblástica no início da osteogênese. Está envolvida na secreção de fosfato, essencial para o processo de mineralização (Millán, 2013). Prado et al. (2015) avaliaram CTM, sob meio osteogênico convencional, sobre amostras porosas de TiCP grau II com e sem tratamento biomimético. O grupo de amostras porosas apresentou as menores taxas de atividade de ALP. Resultados similares em CTM sobre discos de TiCP poroso foram obtidos por Rosa AL et al. (2009). De acordo com estes autores, pode haver um atraso na diferenciação osteoblástica em superfícies porosas, confeccionadas pela técnica da metalurgia de pó, que produz poros sem causar modificações químicas nas superfícies. A maior atividade de ALP encontrada para as superfícies micro e nanotexturizadas deste estudo, pode ser atribuída à combinação de modificações topográficas e químico-estruturais.

Li et al. (2016) avaliaram a atividade de ALP em MC3T3E1 subclone 4 sob meio regular, em superfícies de TiCP grau IV, jateadas com alumina seguidas da imersão em HCl/H₂SO₄, em superfícies tratadas com laser e em superfícies tratadas com laser + HCl/H₂SO₄. As superfícies tratadas com ácidos, independente de jateamento ou laser, apresentaram maior atividade de ALP nos períodos avaliados. Indicando também um possível efeito sinérgico de modificações topográficas e químico-estruturais resultantes do condicionamento ácido na atividade de ALP.

Houve maior atividade de ALP em CTMh nas superfícies estudadas, sob os meios de cultivo regular e osteogênico 2, aos 7 dias. Após 14 dias, observou-se maior atividade de ALP para a superfície em nanoescala sob o meio osteogênico 2 e para a superfície em microescala em o meio regular. Ambos com diferença estatística quando comparados às superfícies lisas. O meio de cultivo osteogênico 2 parece, portanto, ter favorecido a atividade de ALP nas células sobre a superfície nanotexturizada em CTMh.

Maior atividade de ALP foi observada em células MC3T3E1 subclone 42 nas superfícies estudadas sob os meios de cultivo regular e osteogênico 2, após 7 dias. Aos 14 dias, observou-se maior atividade de ALP para a superfície em microescala ($p < 0,05$) sob meio osteogênico 2, quando comparada à superfície lisa. Em meio regular, as células sobre as superfícies apresentaram maior atividade de ALP para as superfícies em micro e em nanoescala, sem diferença estatística quando comparadas à superfície lisa. O meio de cultivo osteogênico 2 parece, portanto, ter favorecido a atividade de ALP nas células sobre a superfície microtexturizada.

CTM diferenciadas em osteoblastos podem ser evidenciadas pelo método de coloração de UFC-Ob, por meio da atividade de ALP. Nesse estudo obteve-se maior quantidade de UFC-Ob em CTMc sobre a superfície microtexturizada. No ensaio de ALP foi observada maior atividade de ALP em CTMh sobre a superfície microtexturizada, em meio regular, aos 14 dias. Em células MC3T3E1 sob as mesmas condições, também se observou sobre as superfícies micro e nanotexturizadas, maior atividade de ALP comparadas à superfície lisa ($p > 0,05$). O meio regular utilizado para cultivo das CTMc no ensaio de UFC-Ob e para o ensaio de atividade de ALP em CTMh e MC3T3E1 subclone 42, apresentou efeito semelhante sobre as células cultivadas sobre a superfície microtexturizada com relação a ALP. Bang et al. (2014) também

observaram maior atividade de ALP em superfícies microtexturizadas após condicionamento ácido, comparadas com superfícies lisas.

Desde 1990, estudos têm se focado nas modificações em nanoescala, por alcançarem um ambiente semelhante ao natural, devido às alterações químicas e nanoestruturais que permitem uma relação biomimética entre o substrato e os tecidos (Mendonça G, 2008, 2010). Além disso, a possibilidade de investigar essa interação em nanoescala permitiria melhor entendimento do mecanismo de falha e sucesso dos implantes. A superfície nanotexturizada criada nesse estudo, é o resultado de características nanotopográficas obtidas sobre uma superfície microtexturizada. Essas modificações topográficas e químico-estruturais são responsáveis por sinalizações que levam a alterações nas funções celulares, como no processo de mineralização (Elias, Meirelles, 2010).

O processo de mineralização ocorre em uma matriz extracelular rica em colágeno (Addison et al., 2007), grande quantidade de matriz mineralizada é depositada em topografias porosas (Rosa AL et al., 2009). Observaram-se melhores resultados de deposição de cálcio nas células sobre a superfície nanotexturizada, sob todas as condições avaliadas neste estudo. Os meios de cultivo utilizados não influenciaram os resultados obtidos em CTMh e em pré-osteoblastos, indicando que características isoladas da superfície nanotexturizada apresentaram papel importante nos resultados obtidos.

No estudo de Andrade et al. (2015), foi possível verificar que a formação de matriz mineralizada foi associada à topografia porosa, juntamente com a modificação da composição química do titânio. Esses resultados também foram confirmados nos estudos de Buser et al. (2004), Zhao et al. (2005), Mendonça DB et al. (2011), nos quais os autores observaram maior mineralização em superfícies de TiCP submetidas a tratamentos ácidos, comparadas com superfícies sem tratamentos ácidos. Zhu W et al. (2015) observaram maiores índices de deposição de cálcio em CTM sobre as superfícies de TiCP com nanorecobrimento de plasma. As superfícies sem recobrimento apresentaram os menores níveis de mineralização.

Em células MC3T3E1 subclone 42, os meios de cultivo celular não interferiram nos resultados obtidos para deposição de cálcio. As superfícies em micro e nanoescala apresentaram maior deposição de cálcio ($p < 0,05$) quando comparadas às lisas, sob ambos os meios de cultivo regular e osteogênico 2, aos 28 dias.

Colágeno 5a3 (*col5a3*) é um gene que codifica uma cadeia de um dos colágenos fibrilares de baixa abundância, é encontrado em tecidos que contenham colágeno do tipo I, regulam as fibras de ambos os tipos I e V (Wu et al., 2010). Observou-se maior expressão de colágeno em MC3T3E1 subclone 14, sob meio regular na superfície nanotexturizada. Os suplementos utilizados no meio osteogênico 2 parecem ter favorecido a expressão do colágeno na superfície micro, que apresentou maior expressão do que a nanotexturizada. Também foi encontrada maior produção de colágeno na matriz extracelular de acordo com a rugosidade da superfície de implantes no estudo de Mendonça DB et al. (2011), quando comparados com discos de titânio de superfície lisa.

Avaliar efeitos da diferenciação de CTM em nanotopografias é um desafio, pois a maioria dos estudos não analisa separadamente esses efeitos na ausência de suplementos osteogênicos, dificultando o entendimento do real potencial osteogênico do biomaterial nesse processo. O papel da nanotopografia na diferenciação osteogênica em CTM ainda vem sendo estudado (Dobbenga et al., 2016).

Estudos têm mostrado que mesmo na ausência de suplementos osteogênicos (Dalby et al., 2008; Dobbenga et al., 2016), CTM podem sofrer influência da nanotopografia de superfície e se diferenciar em osteoblastos. Sugere-se que populações de CTM sejam sensíveis às nanotopografias (Guo J et al., 2007; Mendonça G et al., 2010). Adicionalmente, o padrão de expressão de alguns genes osteogênicos tem sido diferente em superfícies micro e nanotexturizadas (Mendonça G et al., 2008; Vetrone et al., 2009).

Os fatores de transcrição *Runx2*, *Sp7*, *Satb2* e *Prrx1* são importantes para diferenciação osteoblástica. O *Satb2* também apresenta importante papel no desenvolvimento crânio-facial (Yan et al., 2011), o *Prrx1* é um importante fator de transcrição na condrogênese e no desenvolvimento ósseo (Berge et al., 2001; Peterson et al., 2005; Hopwood et al., 2009).

Os fatores de transcrição *Runx2*, *Satb2* e *Sp7* apresentaram-se mais expressos nas células cultivadas em meio regular do que em meio osteogênico 2, na superfície nanotexturizada, comparada ao grupo controle. Portanto, houve uma influência negativa na expressão desses genes em meio osteogênico 2.

As células apresentaram maior expressão do fator de transcrição *Prrx1* sobre a superfície lisa, seguida da microtexturizada e da nanotexturizada, em meio

osteogênico 2. O inverso ocorreu com a expressão desse gene quando cultivadas em meio regular (maior expressão em superfícies rugosas comparadas à lisa). Nesse caso, o meio de cultivo osteogênico 2 influenciou negativamente a expressão do *Prrx1* nas células sobre as superfícies micro e nanotexturizadas.

A expressão de *Alp* foi maior na superfície nanotexturizada em meio osteogênico 2 ($p < 0,05$) do que em meio regular, comparada ao controle. A expressão da *Bmp2* se apresentou semelhante nas células sobre a superfície nanotexturizada, nos dois tipos de meio de cultivo. Sobre a superfície microtexturizada, a expressão de *Alp* e de *Bmp2* apresentou-se semelhante nas células cultivadas com os dois tipos de meio utilizados.

A sialoproteína óssea (*Ibsp*) apresentou-se muito mais expressa nas células sobre a superfície nanotexturizada, em meio osteogênico 2 e em meio regular, comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). Em ambos os meios de cultivo a *Ibsp* também foi mais expressa nas células sobre os discos microtexturizados, comparados ao controle. Em meio regular, observou-se, inclusive diferença estatística para esta superfície com relação ao controle.

Embora não tenha sido encontrada significativa correlação entre a expressão de fatores de crescimento e *Runx2*, uma correlação positiva e fortemente associada à expressão de *Runx2* e de *Alp* e *Ibsp* foi encontrada em superfícies anodizadas e tratadas com ácido, comparadas à superfície usinada no estudo de Oliveira et al. (2013). Observou-se essa mesma correlação nas células sobre a superfície nanotexturizada, em meio regular e osteogênico 2, em relação ao grupo controle. Ainda, maior expressão dos genes *Alp* e *Ibsp* foi observada na superfície microtexturizada, sob os dois meios de cultivo celular avaliados nesse estudo.

Guo J et al. (2007) encontrou maior expressão de genes como *Runx2*, *Sp7*, *Alp* e *Ibsp* em células MC3T3E1 sobre a superfície em nanoescala (TiO_2/HF) comparadas com a expressão gênica em células aderidas na superfície em microescala (TiO_2). O meio de cultivo osteogênico utilizado por esses autores também não incluiu a dexametasona. O mesmo padrão de expressão desses genes, sob os dois meios de cultivo celular, foi observado no presente estudo, com exceção do *Sp7* em meio osteogênico 2.

Mendonça G et al. (2009) avaliaram a expressão de genes osteogênicos em superfícies de titânio lisa, microtexturizada (HCl) e nanotexturizada

(nanorecobrimento com alumina, com rutilo, com anatase e com zircônia). Os autores observaram maior expressão de *Sp7* e *Ibsp* nas superfícies nanotexturizadas em relação às microtexturizadas. A superfície com nanorecobrimento de alumina apresentou os melhores níveis de expressão osteogênica no estudo. Os autores incluíram a dexametasona no meio de cultivo osteogênico utilizado. Foi observada maior expressão nas células dos mesmos genes, em meio regular, na superfície nanotexturizada no presente estudo.

De forma geral, as células sobre a superfície micro e nanotexturizadas, apresentaram melhor expressão dos genes avaliados, em meio regular. Diferenças estatísticas foram encontradas somente para a *Alp* e para a *Ibsp* nas células cultivadas em meio osteogênico 2, sobre a superfície nanotexturizada com relação ao controle. Observou-se diferença estatística na expressão de *Ibsp* em células cultivadas em meio regular, sobre as superfícies micro e nanotexturizadas, comparadas ao controle.

Padrões atuais de caracterização de implantes dentários apresentam técnicas e avaliações limitadas das propriedades das superfícies, muitas vezes não representando o que realmente ocorre após modificações (Elias, Meirelles, 2010). Isso pode ser visto em resultados com diferenças significantes de valores de rugosidade entre implantes com o mesmo tipo de tratamento (Rosa MB et al., 2013). A modificação química por exemplo, provavelmente resulta na adição de novas estruturas e, ao mesmo tempo, na alteração da molhabilidade da superfície do material, propriedades conhecidas por influenciar as interações entre as células e o substrato (Elias, Meirelles, 2010).

Para possibilitar melhor interpretação e comparação de resultados biológicos obtidos das inúmeras topografias e modificações químicas e físicas existentes, se faz necessário um sistema de classificação com terminologia consensual baseada na padronização dos parâmetros utilizados na obtenção das superfícies de implantes (Ehrenfest et al., 2010; Elias, Meirelles, 2010). É importante que mesmo os tratamentos que já vêm sendo utilizados, sejam validados pelas empresas que os fornecem (Rosa MB et al., 2013).

Os dados das superfícies devem permitir ao clínico informações relacionadas ao processo de fabricação para melhor seleção dos implantes. Um protocolo específico de análise da superfície, poderia ser estabelecido fornecendo diretrizes para futura fabricação de implantes (Ogle, 2015).

6 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais deste estudo, foi possível concluir que:

- A diferenciação osteogênica é influenciada tanto pelos efeitos sinérgicos dos tratamentos empregados para a criação de superfícies micro e nanotexturizadas, quanto pelo tipo celular e pelos meios de cultivo utilizados nos testes biológicos;

- A superfície nanotexturizada apresenta maior potencial de induzir mineralização e expressão gênica *in vitro*, comparada às superfícies lisa e microtexturizada, independente do tipo celular e/ou meio de cultivo utilizados;

- As CTMh cultivadas em meio osteogênico 2 apresentam maior potencial osteogênico, expresso pela atividade de ALP, sobre superfície nanotexturizada do que a lisa ou microtexturizada.

REFERÊNCIAS†

- Addison WN, Azari F, Sorensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem.* 2007;282(21):15872–83.
- Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10 Suppl 2:S96-101.
- 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(5):536–43.
- Andrade DP, de Vasconcellos LM, Carvalho IC, Forte LF, de Souza Santos EL, Prado RF, et al. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;56:538–44.
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000;21(7):667–81.
- Balmayor ER. Targeted delivery as key for the success of small osteoinductive molecules. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;94:13–27.
- Bang SM, Moon HJ, Kwon YD, Yoo JY, Pae A, Kwon IK. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(7):831–7.
- Beloti MM, Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Braz Dent J.* 2005;16(2):156–61.
- Berge D, Brouwer a, Korving J, Reijnen MJ, van Raaij EJ, Verbeek F, et al. Prx1 and Prx2 are upstream regulators of sonic hedgehog and control cell proliferation during mandibular arch morphogenesis. *Development.* 2001;128(15):2929–38.
- Bhat S, Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomater.* 2013;Jul-Sep;3(3). pii: e24717. doi: 10.4161/biom.24717.
- Bouillaguet S, Wataha JC, Lockwood PE, Galgano C, Golay A, Krejci I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Oral Sci.* 2004;112(2):182–7.

† Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bruinink A, Bitar M, Pleskova M, Wick P, Krug HF, Maniura-Weber K. Addition of nanoscaled bioinspired surface features: A revolution for bone related implants and scaffolds? *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(1):275–94.

Bueno Rde B, Adachi P, de 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(3):179–84.

Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*. 2004;83(7):529–33.

Chai WL, Brook IM, Palmquist A, van Noort R, Moharamzadeh K. The biological seal of the implant-soft tissue interface evaluated in a tissue-engineered oral mucosal model. *J R Soc Interface*. 2012;9(77):3528–38.

Chan KH, Zhuo S, Ni M. Priming the surface of orthopedic implants for osteoblast attachment in bone tissue engineering. *Int J Med Sci*. 2015; Aug 14;12(9):701-7. doi: 10.7150/ijms.12658.

Chen H, Liu N, Xu X, Qu X, Lu E. Smoking, radiotherapy, diabetes and osteoporosis as risk factors for dental implant failure: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013; Aug 5;8(8):e71955. doi: 10.1371/journal.pone.0071955.

Chen WC, Chen YS, Ko CL, Lin Y, Kuo TH, Kuo HN. Interaction of progenitor bone cells with different surface modifications of titanium implant. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014/01/18. 2014;37:305–13.

Dalby MJ, Andar A, Nag A, Affrossman S, Tare R, McFarlane S, Oreffo RO. Genomic expression of mesenchymal stem cells to altered nanoscale topographies. *R Soc Interface*. 2008 Sep 6;5(26):1055-65. doi: 10.1098/rsif.2008.0016.

Dobbenga S, Fratila-Apachitei LE, Zadpoor AA. Nanopattern-induced osteogenic differentiation of stem cells – A systematic review. *Acta Biomater*. 2016; Dec;46:3-14. doi: 10.1016/j.actbio.2016.09.031.

Duyck J, Vandamme K. The effect of loading on peri-implant bone: A critical review of the literature. *J. Oral Rehabil*. 2014 Oct;41(10):783-94. doi: 10.1111/joor.12195.

Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: Materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol*. 2010; Apr;28(4):198-206. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.12.003.

El-Hajje A, Kolos EC, Wang JK, Maleksaeedi S, He Z, Wiria FE, et al. Physical and mechanical characterisation of 3D-printed porous titanium for biomedical applications. *J. Mater. Sci Mater Med*. 2014;25(11):2471–80.

Elias CN, Meirelles L. Improving osseointegration of dental implants. *Expert Rev Med Devices*. 2010;7(2):241–56.

Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2012;8(9):3191–200.

Freitas GP, Lopes HB, Martins-Neto EC, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Effect of surface nanotopography on bone response to titanium implant. *J Oral Implantol.* 2016;42(3):240–7.

Gaintantzopoulou M, Zinelis S, Silikas N, Eliades G. Micro-Raman spectroscopic analysis of TiO₂ phases on the root surfaces of commercial dental implants. *Dent Mater.* 2014;30(8):861–7.

Gaviria L, Salcido JP, Guda T, Ong JL. Current trends in dental implants. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2014;40(2):50–60.

Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK. Ti based biomaterials , the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Prog Mater Sci.* 2009;54(3):397–425.

Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z, Boyan BD. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: Lessons for spine implants. *Acta Biomater.* 2014a; Aug;10(8):3363-71. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.037.

Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater.* 2014b; Jul;10(7):2907-18. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.032.

Guo J, Padilla RJ, Ambrose W, De Kok IJ, Cooper LF. The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO₂ grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. *Biomaterials.* 2007;28(36):5418–25.

Guo Y, Chen D, Lu W, Jia Y, Wang L, Zhang X. Corrosion resistance and in vitro response of a novel Ti₃₅Nb₂Ta₃Zr alloy with a low Young's modulus. *Biomed Mater.* 2013;8(5):55004.

Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, Korkusuz P, Purali N, Koç N, et al. Osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells on different titanium surfaces. *Biomed Mater.* 2012;7(4):45006.

Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol.* 2009;57(4):318–23.

Hopwood B, Tsykin A, Findlay DM, Fazzalari NL. Gene expression profile of the bone microenvironment in human fragility fracture bone. *Bone.* 2009;44(1):87–101.

Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *Biomed Res Int.* 2015;2015:791725. doi: 10.1155/2015/791725.

- Kulkarni M, Mazare A, Gongadze E, Perutkova Š, Kralj-Iglič V, Milošev I, et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology*. 2015;26(6):62002.
- Kulkarni M, Mazare A, Park J, Gongadze E, Killian MS, Kralj S, et al. Protein interactions with layers of TiO₂ nanotube and nanopore arrays: Morphology and surface charge influence. *Acta Biomater*. 2016;45:357–66.
- Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(5):117.
- Li L, Kim S, Cho S. Comparison of alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells cultured on different Ti surfaces: modified sandblasted with large grit and acid-etched (MSLA), laser-treated, and laser and acid-treated Ti surfaces. *J Adv Prosthodont*. 2016;8(3):235–40.
- Lin X, Zhou L, Li S, Lu H, Ding X. Behavior of acid etching on titanium: topography, hydrophilicity and hydrogen concentration. *Biomed Mater*. 2014 Feb;9(1):015002. doi: 10.1088/1748-6041/9/1/015002.
- Liu H, Webster TJ. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials*. 2007;V(N):354–69.
- Lorenzetti M, Biglino D, Novak S, Kobe S. Photoinduced properties of nanocrystalline TiO₂-anatase coating on Ti-based bone implants. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;37(1):390–8.
- Matassi F, Botti A, Sirleo L, Carulli C, Innocenti M. Porous metal for orthopedics implants. *Clin Cases Min. Bone Metab*. 2013;10(2):111–5.
- Mendonça DB, Miguez PA, Mendonça G, Yamauchi M, Aragão FJ, Cooper LF. Titanium surface topography affects collagen biosynthesis of adherent cells. *Bone*. 2011;49(3):463–72.
- Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials*. 2008;29(28):3822–35.
- Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. The combination of micron and nanotopography by H₂SO₄/H₂O₂ treatment and its effects on osteoblast-specific gene expression of hMSCs. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94(1):169–79.
- Mendonça G, Mendonça DB, Simões LG, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, et al. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials*. 2009;30(25):4053–62.
- Millán JL. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif Tissue Int*. 2013 Oct;93(4):299-306. doi: 10.1007/s00223-012-9672-8.

Minagar S, Berndt CC, Wang J, Ivanova E, Wen C. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta Biomater.* 2012;8(8):2875–88.

Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res.* 1998;40(2):324–35.

Niinomi M, Nakai M, Hieda J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2012;8(11):3888–903.

Ogle OE. Implant surface material, design, and osseointegration. *Dent Clin North Am.* 2015;59(2):505–20.

Oliveira NCM, Moura CCG, Zanetta-Barbosa D, Mendonça DBS, Cooper L, Mendonça G, et al. Effects of titanium surface anodization with CaP incorporation on human osteoblastic response. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(4):1958–62.

Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Env Sci.* 2015;28(1):57–71.

Peterson RE, Hoffman S, Kern MJ. Opposing roles of two isoforms of the Prx1 homeobox gene in chondrogenesis. *Dev Dyn.* 2005;233(3):811–21.

Prado RF, Rabêlo SB, de Andrade DP, Nascimento RD, Henriques VA, Carvalho YR, et al. Porous titanium and Ti-35Nb alloy: effects on gene expression of osteoblastic cells derived from human alveolar bone. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(11):259.

Rath SN, Brandl A, Hiller D, Hoppe A, Gbureck U, Horch RE, et al. Bioactive copper-doped glass scaffolds can stimulate endothelial cells in co-culture in combination with mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2014;9(12):e113319.

Rosa AL, Crippa GE, De Oliveira PT, Taba 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 Implants Res.* 2009;20(5):472–81.

Rosa MB, Albrektsson T, Francischone CE, Filho HOS, Wennerberg A. Micrometric characterization of the implant surfaces from the five largest companies in Brazil, the second largest worldwide implant market. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(2):358–65.

Rüger M, Gensior TJ, Herren C, von Walter M, Ocklenburg C, Marx R, et al. The removal of Al₂O₃ particles from grit-blasted titanium implant surfaces: effects on biocompatibility, osseointegration and interface strength in vivo. *Acta Biomater.* 2010;6(7):2852–61.

Rupp F, Gittens RA, Scheideler L, Marmur A, Boyan BD, Schwartz Z, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects. *Acta Biomater.* 2014; Jul;10(7):2894-906. doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.040.

Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials.* 2004;25(7-8):1429-38.

Saita M, Ikeda T, Yamada M, Kimoto K, Lee MC, Ogawa T. UV photofunctionalization promotes nano-biomimetic apatite deposition on titanium. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:223-34.

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(5):459-66.

Sinha KM, Zhou X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J Cell Biochem.* 2013;114(5):975-84.

Smith GS, Snyder RL. FN: A criterion for rating powder diffraction patterns and evaluating the reliability of powder-pattern indexing. *J Appl Crystallogr.* 1979;12(1):60-5.

Strecker S, Fu Y, Liu Y, Maye P. Generation and characterization of Osterix-Cherry reporter mice. *Genesis.* 2013;51(4):246-58.

Szmukler-Moncler S, Bischof M, Nedir R, Ermrich M. Titanium hydride and hydrogen concentration in acid-etched commercially pure titanium and titanium alloy implants: a comparative analysis of five implant systems. *Clin. Oral Implants Res.* 2010;21(9):944-50.

Variola F, Brunski JB, Orsini G, Tambasco de Oliveira P, Wazen R, Nanci A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale.* 2011;3(2):335-53.

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(10):1285-98.

Vetrone F, Variola F, De Oliveira PT, Zalzal SF, Yi JH, Sam J, et al. Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. *Nano Lett.* 2009;9(2):659-65.

Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Min Res.* 1999;14(6):893-903.

Wittkowske C, Reilly GC, Lacroix D, Perrault CM. In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016;4:87.

Wu YF, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yoshioka H. The Sp1 and CBF/NF- κ B transcription factors cooperatively regulate the mouse pro- α 3(V) collagen gene (Col5a3) in osteoblastic cells. *Acta Med. Okayama*. 2010;64(2):95–108.

Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, Reith E, Benson MD, Franceschi RT. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Min Res*. 2002;17(1):101–10.

Xu J, Weng X-J, Wang X, Huang J-Z, Zhang C, Muhammad H, et al. Potential Use of Porous Titanium-Niobium Alloy in Orthopedic Implants: Preparation and experimental study of Its biocompatibility in vitro. *PLoS One*. 2013 Nov 19;8(11):e79289. doi: 10.1371/journal.pone.0079289.

Yan SG, Zhang J, Tu QS, Ye JH, Luo E, Schuler M, et al. Enhanced osseointegration of titanium implant through the local delivery of transcription factor SATB2. *Biomaterials*. 2011;32(33):8676–83.

Zhang W, Wang G, Liu Y, Zhao X, Zou D, Zhu C, et al. The synergistic effect of hierarchical micro/nano-topography and bioactive ions for enhanced osseointegration. *Biomaterials*. 2013;34(13):3184–95.

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*. 2005;74(1):49–58.

Zhu W, Teel G, O'Brien CM, Zhuang T, Keidar M, Zhang LG. Enhanced human bone marrow mesenchymal stem cell functions on cathodic arc plasma-treated titanium. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:7385–96.

Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl R, Geis-Gerstorfer J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials*. 2004;25(18):4087–103.

Zhuang XM, Zhou B, Ouyang JL, Sun HP, Wu YL, Liu Q, et al. Enhanced MC3T3-E1 preosteoblast response and bone formation on the addition of nano-needle and nano-porous features to microtopographical titanium surfaces. *Biomed Mater*. 2014;9(4):45001.