



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Fernanda Florian

**Avaliação física, química e biológica em diferentes superfícies de uma liga de
titânio-molibdênio**

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista



“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Fernanda Florian

**Avaliação física, química e biológica em diferentes superfícies de uma liga de
titânio-molibdênio**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Periodontia, na área de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara

2018

Florian, Fernanda

Avaliação física, química e biológica em diferentes superfícies de uma liga de titânio-molibdênio. / Fernanda Florian. – Araraquara: [s.n.], 2018

78 f. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1. Titânio 2. Teste de Materiais 3. Osteogênese I. Título

Fernanda Florian

**Avaliação física, química e biológica em diferentes superfícies de uma liga de
titânio-molibdênio**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2º examinador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

3º examinador: Prof. Dr. Luis Geraldo Vaz

4º examinador: Prof. Dr. Rogério Margonar

5º examinador: Prof. Dr. Walter Martins Junior

Araraquara, 23 de Março de 2018.

DADOS CURRICULARES

FERNANDA FLORIAN

NASCIMENTO	18 de Agosto de 1983 - São Paulo / SP.
FILIAÇÃO	Carlos Antônio Florian Neiva de Camargo Florian
2005 – 2008	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
2009 – 2011	Curso de Aprimoramento em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilo-facial pela Fundação do Desenvolvimento Administrativo – FUNDAP.
2012 – 2014	Curso de Especialização em Implantodontia pela Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD.
2012 – 2014	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
2014 – 2018	Curso Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

À **Deus**, criador do Universo que nos concede a cada dia uma nova oportunidade, iluminando os pensamentos e guiando meus passos. Agradeço por todas as pessoas envolvidas em minha vida que tornaram possível a conquista de novos objetivos, nos dão fé e esperança com suas palavras e sorrisos.

Aos meus pais **Carlos Antonio Florian** e **Neiva de Camargo Florian (in memorian)** que com muito amor, dedicação e humildade foram os responsáveis diretos por minha educação e valores. Por todo apoio em minhas escolhas e, com amor e confiança, por estarem presentes ao meu lado durante toda vida.

À minha irmã **Fabiana Florian**, pelo estímulo e participação na minha carreira acadêmica. Pelo exemplo de profissional dedicada que procuro seguir, pelo carinho, incentivo e eterna amizade.

Ao meu marido **André da Motta Gonçalves**, quem eu amo, agradeço pelo companheirismo e compreensão nas horas dedicadas a elaboração da tese. Pela confiança em meu trabalho e exemplo de profissional na qual procuro seguir os passos, ao seu lado.

Minha eterna gratidão por todos vocês fazerem parte da minha vida.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, pela orientação na elaboração dessa tese, pela confiança e respeito. Por acreditar em meu potencial profissional e participar dessa etapa da minha carreira acadêmica. Pelo exemplo de pessoa e profissional.

À amiga Ms. **Mariana Aline Cominotte** por todo apoio e dedicação no desenvolvimento desse trabalho. É exemplo de profissional que com toda paciência e compreensão me ajudou nessa etapa da carreira acadêmica. Meus sinceros agradecimentos pela convivência e votos de sucesso.

À amiga Dr. **Luana Carla Pires** que me ajudou a trilhar os primeiros passos em pesquisas laboratoriais na área de Biomaterias. Sua dedicação, competência e seriedade no trabalho acadêmico ficam de exemplo que pretendo seguir. Meus sinceros agradecimentos pela convivência e votos de sucesso.

Aos colegas Dr. Diego Pedreira da Silva, Dr. Fernando Guastaldi e Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi por seu apoio na elaboração e confecção dos discos de Ti com os tratamentos químicos utilizados.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de sua Diretora, Prof^ª. Dr^ª **Elaine Maria Sgavioli Massucato** e do Vice-Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli** e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia, pela excelência no ensino e pesquisa, dedicação e apoio aos alunos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**, que colaborou financeiramente na pesquisa (n^o 0571/2017).

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof.Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Prof^ª. Dr^ª. **Rosemary Adriana Chiérics Marcantonio**, Prof. Dr. **José Eduardo César Sampaio**, Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior**, Prof^ª. Dr^ª. **Silvana Regina Perez Orrico**, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, Prof^ª. Dr^ª. **Daniela Leal Zandim-Barcelos** e Prof^ª. Dr^ª. **Morgana R. Guimarães Stabili** que colaboraram com muita competência minha formação acadêmica na Periodontia.

Aos Docentes da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial: **Prof. Dr. Valfrido A. Pereira Filho**, **Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira**, **Profa. Dra. Marisa A. Cabrini Gabrielli**, **Prof. Dr. Roberto Henrique Barbeiro**, **Prof. Dr. José Scarso Filho** e **Prof. Dr. Mário Francisco R. Gabrielli** que tiveram fundamental importância em minha formação profissional desde a iniciação científica até os dias de hoje.

Em especial, a **Profa. Dra. Eleny Balducci Roslindo** que com muita paciência me ensinou os primeiros passos acadêmicos na iniciação científica da Disciplina de Histologia e Embriologia Humana, meus sinceros sentimentos de gratidão

Aos amigos de turma do Doutorado (2014-2018): pelo companheirismo e oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, novas amigas que com certeza se preservarão por muito tempo.

À todos os funcionários da Disciplina de Periodontia e Cirurgia: **Isabela Cristine Manzolli Rodrigues, Ana Cláudia Gregolin Costa Miranda, Suleima Ferreira, Priscila Gabriela Gentile, Thelma Aparecida Gomes e Antonio Medeiros Filho** pela atenção reservada a todos os alunos, sempre com carinho e dedicação, tornando possível a realização desta jornada acadêmica.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier** pela gentileza que sempre nos receberam na Seção de Pós Graduação, resolvendo nossas dúvidas com paciência e competência.

Aos funcionários da Biblioteca: **Maria Inês Carlos, Maria Aparecida Capella Carvalho, Ana Cristina Jorge e Laudicélia Martins Arantes** da Seção Técnica de Referência, Atendimento ao Usuário e Documentação; também **Marley Cristina Chiusoli Montagnoli e Denise Floriano da Silva** da Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação e **Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas**, Diretora Técnica de Serviço, pela disposição em ajudar aos alunos com eficiência, gentileza e agilidade.

Florian F. Avaliação física, química e biológica em diferentes superfícies de uma liga de titânio-molibdênio [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Com o alto índice de sucesso dos implantes, o desenvolvimento de novas ligas e tratamentos de superfície tem sido o grande enfoque das pesquisas da área. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a liga binária composta de Ti-15Mo que recebeu um tratamento químico a base de ácido fosfórico, seguido ou não por tratamento de hidróxido de sódio e também tratamento de laser com deposição de apatita para em seguida avaliar a resposta in vitro de osteoblastos de ratos. A metodologia aplicada avaliou a liga através dos testes de microscopia eletrônica de varredura associada à espectroscopia por energia dispersiva de raios X, medidas de rugosidade e área efetiva com microscópio confocal a laser e ângulo de contato. Os ensaios biológicos verificaram a resposta dos osteoblastos a essas superfícies observando a morfologia, adesão e proliferação celular, além da quantificação de nódulos de mineralização, níveis de atividade de fosfatase alcalina e expressão gênica de marcadores da osteogênese. Os resultados demonstram que os tratamentos de superfície realizados atingiram os objetivos de modificar as características físico-químicas do Ti-cp e Ti-15Mo, de forma que os eventos intermediários observados na RBMSC sugerem favorecer a osseointegração. As células osteoblásticas se comportaram de forma semelhante entre as superfícies tratadas, sem diferenças significativas, sugerindo que a liga Ti-15Mo é uma alternativa para o uso na Implantodontia pelas vantagens de sua propriedade mecânica. Espera-se com esses resultados, determinar benefícios para possíveis aplicações biológicas dessa liga, bem como dos tratamentos de superfície propostos, na Implantodontia.

Palavras chave: Titânio. Teste de materiais. Osteogênese.

Florian F. Physical, chemical and biological evaluation on different surfaces of a titanium-molybdenum alloy [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

With the high success rate of implants, the development of new alloys and surface treatments has been the major focus of research in the area. The aim of this study was to characterize the binary composite alloy of Ti-15Mo that received a chemical treatment based on phosphoric acid, followed or not by sodium hydroxide and also laser treatment with deposition of apatite to next evaluate the in vitro response of rat osteoblasts. The applied methodology evaluated the alloy through scanning electron microscopy associated to X-ray dispersive energy spectroscopy, roughness measurements and effective area with laser confocal microscope and contact angle. The biological tests verified the response of osteoblasts to these surfaces by observing cell morphology, adhesion and proliferation, as well as the quantification of mineralization nodules, levels of alkaline phosphatase activity and gene expression of osteogenesis markers. The results demonstrate that the surface treatments performed reached the goals of modifying the physicochemical characteristics of the Ti-cp and Ti-15Mo alloy, so that the intermediate events observed in the RBMSC suggest that they favor osseointegration. The osteoblastic cells behaved similarly in both alloys and surface treatments, without significant differences, suggesting that the Ti-15Mo alloy is an alternative for the use in the Implantology for the advantages of mechanical property. These results are expected to determine benefits for possible biological applications of this alloy, as well as proposed surface treatments, in Implantology.

Key-words: Titanium. Materials testing. Osteogenesis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Liga Ti-15Mo	14
1.2 Modificações de superfície visando a osseointegração	14
1.3 Modificação de superfícies com o uso de laser	15
1.4 Modificação de superfícies por deposição de apatitas.....	16
1.5 Modificação química de superfícies	17
1.6 Efeito das propriedades das superfícies sobre as respostas biológicas.....	18
1.7 Estudos biológicos.....	19
2 PROPOSIÇÃO	21
3 PUBLICAÇÕES	22
3.1 Publicação 1	22
3.2 Publicação 2	50
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXO A.....	78

1 INTRODUÇÃO

Desde as primeiras décadas do surgimento dos implantes dentários osseointegráveis, pesquisadores tentam compreender os mecanismos envolvidos no processo de formação óssea ao redor dos implantes. Atualmente, com o alto sucesso dos biomateriais e o avanço tecnológico na área, as pesquisas têm focado no entendimento dos mecanismos de interação da superfície do implante com os tecidos ósseos, na busca de implantes com características diferenciadas, que favoreçam o processo de osseointegração^{1,2}.

Existem vários fatores que influenciam a osseointegração e conseqüentemente o sucesso clínico dos implantes: o material de fabricação utilizado (titânio comercialmente puro ou ligas), a forma do implante (macroestrutura), o tipo de superfície (microestrutura) e, atualmente em destaque, a existência de modificações nanoestruturais³. O aperfeiçoamento do material utilizado visa melhorar a resistência mecânica, resistência à corrosão e desgaste, associado a uma adequada distribuição de forças no leito ósseo e resistir a cargas mastigatórias por um longo período⁴.

Os metais mais utilizados nos implantes comercializados atualmente são o titânio comercialmente puro (Ticp), a liga Ti-6Al-4V (titânio-6alumínio-4vanádio) e liga Ti-13Nb-13Zr (titânio-nióbio-zircônio)^{3,5}. O titânio comercialmente puro exibe características desejáveis como alta relação resistência/densidade, boa resistência à corrosão e biocompatibilidade. A adição de outros elementos, como alumínio, vanádio, molibdênio, é realizada com intuito de conferir uma melhora nas propriedades mecânica e química, suportar cargas mastigatórias e interagir adequadamente com o osso ao seu redor^{4,6}.

As propriedades mecânicas desejadas nas ligas de titânio vão depender da relação quantitativa e qualitativa das fases α e β do metal. O titânio α é muito suscetível à formação de mesclas de deformação e ao superaquecimento, o que produz uma estrutura distorcida⁷. Pesquisas que estudam o aperfeiçoamento das ligas de Ti para Implantodontia visam as ligas do tipo β , que possui características como baixo módulo de elasticidade, assemelhando-se mais ao módulo de elasticidade óssea, maior resistência mecânica e à corrosão e melhor resposta tecidual quando comparadas com ligas tipo $\alpha+\beta$ ^{4,8,9}.

1.1 Liga Ti-15Mo

O molibdênio (Mo) é um dos elementos capaz de estabilizar a fase β do titânio⁸ e as ligas de titânio-molibdênio (Ti-Mo) têm sido objeto de diferentes estudos microestruturais e eletroquímicos^{4,6,8}. A fase α é observada quase que exclusivamente quando a concentração de Mo adicionada ao Ti cp atinge 6%. Uma retenção significativa da fase β é observada para a liga contendo 10% de Mo, enquanto que para concentrações mais elevadas de Mo (15 a 20%) é observada somente a retenção da fase β ⁴. Em estudos eletroquímicos, a liga Ti-Mo apresentou-se com alta resistência à corrosão^{6,8} conferindo para a liga Ti-15Mo uma possível indicação para utilização em Implantodontia.

Em um estudo in vivo que avaliou a resposta biológica tecidual a esta liga¹⁰, no qual cilindros de Ti-15Mo foram inseridos em tíbias de coelhos após dois tipos de tratamentos de superfícies: usinada e modificada por irradiação a laser, foi observado um alto torque de remoção para as superfícies de Ti-15Mo modificadas por laser e uma boa resposta biológica de ambas as superfícies.

1.2 Modificações de superfície visando a osseointegração

A utilização de materiais adequados e tratamentos de superfícies apropriados podem tornar os materiais metálicos bioativos e, com isso, acelerar o processo de osseointegração, culminando em um período de reparo reduzido ao paciente. Frente a esse desafio, o desenvolvimento de superfícies que aceleram o processo de osseointegração dos biomateriais intra-ósseos é um desafio atual em vários campos de pesquisa, tais como, ciência dos materiais, Engenharia, Odontologia, Medicina, Física, Química e Biologia.

As características da superfície dos implantes foram mencionadas por Albrektsson et al.¹¹ (1981), como sendo um dos seis fatores determinantes para incorporação do osso aos implantes. Como este é um fator essencial para o sucesso e sobrevivência dos mesmos, muitos são os estudos sobre os tipos de superfícies existentes, o desenvolvimento de novas superfícies e as respostas celulares in vitro e em modelos in vivo^{2,12}.

As modificações na superfície do implante visam acelerar a osseointegração. Essas modificações podem ser feitas por processos de subtração ou de adição². Dentre os processos de tratamento/modificação por subtração tem-se: o eletropolimento, o polimento mecânico, o jateamento, o condicionamento ácido e a oxidação anódica. Já como processos de adição, podemos citar: os recobrimentos por hidroxiapatitas (HA) e outros compostos a base de Cálcio e Fosfato (apatitas); as superfícies de plasma-spray de titânio e a deposição iônica^{2,13,14}. Esses tratamentos empregados para alteração das superfícies se caracterizam microscopicamente como microalterações ou nanoalterações^{2, 15}.

Estudos têm demonstrado que a topografia da superfície do implante claramente interfere nas respostas celulares tanto nos modelos *in vitro* como *in vivo*¹⁶. Observou-se que o aumento da rugosidade na superfície do implante de Ti-cp promove integração óssea, aumentando a quantidade de osso formado na interface por meio de osteocondução e osteogênese^{17,18}. A topografia da superfície influencia a resposta óssea em nível micrométrico e as alterações em nível nanométrico levam a uma melhor resposta celular, principalmente nos estágios iniciais de interação com o organismo.

1.3 Modificação de superfícies com o uso de laser

A irradiação da superfície do implante por feixe de laser leva a uma superfície microestruturada, com formação de uma camada de óxido de Ti, além de ser um método controlado, altamente reprodutível e sem a presença de contaminantes na superfície¹⁸⁻²¹. O laser de alta potência vem sendo sugerido como opção para obtenção de uma conformação tridimensional da superfície, além de modificar a composição química por meio do aumento da camada de óxido de Ti, favorecendo a resposta celular^{10,19,20}.

Durante a irradiação, a interação feixe de laser/titânio produz efeitos térmicos durante a sequência de pulsos, o que leva a superfície a se fundir e até vaporizar, criando assim um estado de plasma, denominado fenômeno de ablação. Os resultados do processo de fusão e solidificação rápida provocam a difusão de átomos para o titânio na área irradiada, especialmente oxigênio e nitrogênio presentes na atmosfera ambiente, levando ao aumento da camada de óxido de Ti. O óxido de Ti, por sua vez, leva a uma resposta biológica favorável, pois melhora na superfície propriedades importantes tais

como a composição química, a molhabilidade e a energia livre de superfície, além de proteger a estrutura cristalina subjacente contra os efeitos corrosivos do ambiente biológico²².

Khosroshahi et al.²³, publicaram um estudo, em 2009, em que avaliaram a topografia da superfície de Ti-6Al-4V irradiadas com laser, bem como a resposta in vitro e in vivo da mesma. Observaram que a irradiação da amostra levou a uma melhora nas características topográficas e químicas da superfície e que estas alterações produziram respostas positivas nos modelos in vivo e in vitro comparadas ao controle. Faeda et al.²⁴ em 2009, avaliaram o efeito in vivo da utilização de implantes de Ti-cp modificados com irradiação a laser em tibia de coelhos e observou que a interação osso-implante foi maior nos implantes tratados a laser quando comparada ao implante usinado.

Em recente revisão, Hindy et al.²⁵ (2017) verificaram que o tratamento com laser em superfícies de implantes dentários produziu uma porosidade de revestimento uniforme entre as espiras, que diminuiu o tempo de reparo, porém concluíram que o tipo de laser e os parâmetros utilizados nas aplicações podem afetar a biocompatibilidade do implante dentário.

1.4 Modificação de superfícies por deposição de apatitas

As apatitas são compostos minerais a base de cálcio e fosfato, presentes nos tecidos minerais do corpo. A hidroxiapatita (HA) é o principal componente mineral dos ossos, por isso é hoje o composto a base de cálcio e fosfato (CaP) mais estudado como biocerâmica. Além disso, tem sido amplamente utilizada como recobrimentos ou materiais densos para a reposição e reparação do tecido ósseo. Além da HA, outros fosfatos de cálcio também estão presentes em calcificações normais e patológicas¹³.

Nos implantes dentários a HA é utilizada para recobrimento das superfícies, sendo este realizado mais comumente por meio do método plasma-spray e da deposição biomimética^{13,26}. O método biomimético consiste em colocar o substrato a ser recoberto em uma solução sintética, denominada SBF - *Simulated Body Fluid*, de composição iônica e pH semelhantes ao plasma sanguíneo a 37°C. Este método permite recobrir o

substrato com uma camada uniforme de apatitas, semelhante à apatita biológica encontrada no tecido ósseo humano²⁶.

Estudos têm demonstrado que os recobrimentos com CaP conferem ao implante uma superfície com potencial osteocondutor²⁷. Após a implantação, a dissolução do recobrimento leva a liberação dos íons Ca e P na região peri-implantar aumentando a energia iônica e a saturação sanguínea, levando a precipitação de cristais de apatitas biológicas sobre a superfície do implante^{28,29}. A camada de apatita biológica então incorpora proteínas e promove a adesão de células osteoprogenitoras que produzirão a matriz extracelular óssea³⁰.

Observa-se que implantes recobertos com apatitas induzem a uma rápida integração por estimularem os osteoblastos precocemente e, conseqüentemente, levarem a um aumento na formação óssea comparados a implantes não recobertos, especialmente em condições em que exista baixa qualidade e/ou quantidade óssea^{13,30}. Além disso, esse recobrimento potencializa a osteocondução por meio da adsorção e retenção de proteínas estruturais nos estágios iniciais do reparo²⁸.

1.5 Modificação química de superfícies

A literatura tem demonstrado que as superfícies de materiais que contêm características na escala nanométrica, nanotopográfica ou de nanotexturas, favorecem respostas celulares e melhoram a osseointegração, fato que pode ser observado em estudos biológicos com ratos, cães, coelhos e humanos³¹⁻³⁶.

Ataques ácidos da superfície de implantes a base de titânio têm sido amplamente aplicados para alterar a rugosidade, composição da superfície e a molhabilidade/energia superficial³⁷. São de particular interesse os ácidos: clorídrico, sulfúrico, fluorídrico e fosfórico também as misturas destes, por favorecerem consideravelmente a osseointegração sem adição de material à superfície do implante, por exemplo, de hidroxiapatitas ou de partículas do jateamento³⁸.

Alguns métodos de ataques químicos têm sido avaliados quanto ao comportamento frente às células, em ensaios *in vitro*, na busca de compreender os fatores que regulam os processos de adesão, espraiamento, proliferação e diferenciação

de células pluripotentes mesenquimais em osteoblastos e avaliar a expressão gênica destas em diferentes superfícies, ambas envolvidas no processo de osteogênese^{32,39-41}.

Alguns pesquisadores avaliaram as superfícies de implantes dentários de titânio usinado e com ataque ácido, na qual ocorreu a formação de uma topografia micrométrica provocada pela desoxidação e reoxidação da superfície do implante atacado, e ao contrário do que era esperado, não houve a ocorrência de topografia na escala nanométrica. Na análise histológica, a eficiência da modificação de superfície foi comprovada por meio da porcentagem de contato implante/osso, que demonstrou promover maior osteogênese na superfície dos implantes inseridos nas mandíbulas de cães, fato que sugere um aumento de bioatividade durante a remodelação óssea⁴².

Oliveira et al.³² (2004) realizaram a imersão de implantes por 2 horas em solução de H_2SO_4/H_2O_2 , na qual foram observadas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) porções do citoplasma de algumas células com aparência reticulada e células que prolongam-se sobre os metais.

O tratamento alcalino também imprime alterações de composição química, rugosidade e topografia sobre a superfície tratada⁴³. Este tratamento desperta interesse por meio da formação de uma camada de titanato de sódio sobre a qual a precipitação de hidroxiapatita é estimulada. O que se sabe, portanto, é que esse tipo de tratamento estimula a formação de hidroxiapatitas sobre as superfícies dos materiais, no entanto, ainda é escassa a literatura que reporte respostas biológicas em relação às superfícies de materiais tratados alcalinamente sem acondicionamento prévio em SBF.

1.6 Efeito das propriedades das superfícies sobre as respostas biológicas

Alguns fatores relacionados às superfícies dos materiais regulam as características da interface implante/osso, tais como energia de superfície, rugosidade, topografia e sua composição. Estes fatores são importantes e interligados, pois exercem influência sobre o comportamento das células de linhagem osteoblástica durante os processos biológicos que antecedem a osseointegração de um implante.

A **energia livre da superfície** pode ser modificada por meio da alteração da área específica da superfície ou da molhabilidade, sendo que as superfícies hidrofílicas

aparentam ter maior adesão de proteínas comparadas às superfícies hidrofóbicas^{41,44,45}. Segundo Spriano et al.⁴⁶ (2005) um baixo ângulo de contato (30°) já indica boa propriedade hidrofílica, promissora ao sucesso da osseointegração.

É importante observar que níveis de **rugosidade** interferem na adesão e espraiamento celulares e que há um intervalo de valores de rugosidade em que as respostas biológicas são melhores⁴⁷. Segundo estudos prévios, o procedimento de ataque ácido produz picos na superfície de titânio com tamanhos que variam de 0,5 a 2,0 µm de diâmetro^{48,49} sendo que o aumento de rugosidade provoca aumento da adesão, de proliferação e de atividade da fosfatase alcalina, apesar desta última não ter sido considerada estatisticamente significativa⁵⁰.

A **topografia e composição** da superfície podem alterar fatores como adesão e proliferação celulares⁵¹⁻⁵³. O processo de diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos pode ser avaliado pela medida da atividade específica de fosfatase alcalina (ALP), ou seja, durante essa alteração fenotípica há um aumento de fosfatase alcalina no meio da cultura in vitro ou o aumento na produção de osteocalcina ou na expressão gênica referente à produção destas proteínas⁵⁴⁻⁵⁶. Em estudos de Oh S et al.⁵⁷ (2006), a superfície recoberta de nanotubos apresentou melhores respostas de adesão e espraiamento celulares, além de maior atividade de ALP.

1.7 Estudos biológicos

Nos estudos dos biomateriais, os testes in vitro caracterizam a resposta celular frente ao substrato estudado. A utilização do modelo in vitro, além de poder apresentar uma rápida resposta, avalia fatores como a biocompatibilidade, citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular. No caso dos estudos sobre as modificações de superfície, esse modelo ainda fornece a resposta da célula quanto à formação óssea, podendo identificar se a superfície exerce influência positiva ou negativa na osteogênese⁵⁸. Entre as vantagens do modelo in vitro, comparado ao in vivo, pode-se incluir: a reprodutibilidade, rapidez de resultados, alta sensibilidade, custo reduzido e bom controle das variáveis⁵⁸.

Há uma vasta literatura que relata o comportamento de osteoblastos em superfícies de Ti com diversos tratamentos de superfície, sugerindo que tais células apresentaram morfologia poligonal e que pequenas diferenças na proliferação se devam às diferenças dessas células em cada superfície testada^{59,60}. Além disso, estudos de expressão gênica e de mineralização das células nas superfícies de Ti nos fornecem informações sobre a resposta celular frente ao biomaterial, no qual autores demonstraram que a quantidade de formação de nódulos de mineralização está diretamente relacionada com a rugosidade de superfície do Ti^{61,62}. Os genes *BGLAP*, *RUNX2*, *SP7*, *Col1A1*, *ALPL* participam dos eventos do processo de formação óssea⁶³⁻⁶⁷.

Nesta tese, o objetivo consiste em avaliar alguns métodos de modificação de superfície de baixo custo tendo em vista o cenário brasileiro de recursos escassos para aplicação em Saúde. Com este propósito foram realizadas modificações de superfície com tratamentos a laser e químicos que podem provocar alterações das propriedades da superfície, mais especificamente de topografia, rugosidade, ângulo de contato, para em seguida avaliar os efeitos destas propriedades sobre as respostas biológicas, em especial do comportamento de osteoblastos sobre amostras de Ti-cp e Ti-15Mo.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a modificação das superfícies da liga Ti-15Mo, comparada ao Ti-cp, por meio de avaliações físicas, químicas e biológicas após diferentes tratamentos de superfície, descritos a seguir:

- a) ataque ácido com H_3PO_4 combinado ou não com tratamento alcalino de NaOH (Publicação 1)
- b) tratamento a laser combinado com deposição de apatita (Publicação 2).

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Publicação 1

**Physical-chemical and biological analyses of the titanium molybdenum alloy with
chemical surface treatment***

Florian F¹, Cominotte MA¹, Pedreira de Oliveira D², Bolfarini C², Cirelli JA¹

(1) Department of Diagnosis and Surgery - Periodontology, Sao Paulo State University - Unesp, School of Dentistry at Araraquara, Araraquara, Sao Paulo, Brazil.

(2) Department of Materials Engineering, Federal University of Sao Carlos, Sao Carlos, Sao Paulo, Brazil.

Requests should be sent to: cirelli@foar.unesp.br

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Joni Augusto Cirelli – Depto de Diagnóstico e Cirurgia – Periodontia

Rua Humaitá, 1680 - Centro – (14801-903) - Araraquara, SP.

Abstract

Purpose: The aim of this study was to evaluate physico-chemical and biological characteristics of the titanium-15% molybdenum alloy (Ti-15Mo) with chemically modified surface. **Methods:** Discs of Ti-15Mo and of commercially-pure titanium (Ti-cp) were subjected or not to chemical surface treatment by phosphoric acid etching (Ac) followed or not by alkaline treatment with NaOH (Acbs). Physical and chemical composition were evaluated. Osteoblast precursor bone mesenchymal stem cells (*BMSC*) differentiation and matrix mineralization were evaluated after cell culture over the surfaces. **Results:** Acbs presented increased roughness (R_a) and wettability for both alloys. After 7 days, a great number of cytoplasmatic prolongations was observed on Ac and Acbs treated surfaces. Fluorescence showed a more advanced cellular development for Ac and Acbs Ti-15Mo. The Acbs groups also presented an increased viability for Ti-cp (at 7 days) and Ti-15Mo (at 21 days) in intra-group comparisons ($p < 0.05$). Genic expression of molecules related to osteoblastic phenotype was up-regulated after 7 days for both alloys and tended to be higher on Ac and Acbs surfaces. Mineral nodules formation was more pronounced on Acbs surfaces. **Conclusion:** Ti-15Mo with chemically treated surface presented suitable physic and chemical characteristics and favored cellular responses suggesting its application for dental implants production.

Keywords: Surface analysis, Titanium alloys, Biocompatibility, Osteogenesis, Cell culture

Introduction

Titanium (Ti) dental implants are commonly used in dentistry for rehabilitation of missing teeth. Current research has focused on understanding the implant surface interaction mechanisms with the peri-implant tissues seeking for implants which

encourage or stimulate osseointegration in areas with bone limitation or in patients with impaired reparative potential^{1,2}.

In the last several decades titanium and its alloys have been extensively used as materials for orthopedic implants, dental implants, and medical devices³. Processing the used material is intended for improving mechanical strength, preventing corrosion and wear, together with a suitable force distribution to the bone. In addition, recent researches have looked for increasingly effective materials in order to speed up osseointegration, improve the response of the surrounding tissue and resist mechanical loads for longer period of time⁴.

Nowadays, there is an increased demand for surface properties able to control cellular activities by cell contact with well-designed substrates. Important advances in this field have been reached using *in vitro* research to evaluate biological responses with cell lineages appropriated to specific applications^{5,6}. A wide scientific and technological advance in lab scale cell culture has supported the development of tissue engineering and biomaterials fields⁷.

In this context, effective area, composition, roughness, topography and wettability (contact angle) are important properties regulating the interface bone/implant. Therefore, the topographic formation presents a key role to influence cellular responses or behavior on implant surface. After the mechanical interlocking to establish the primary stability, dental or orthopedic intraosseous implants have their surface subjected to osteoblasts adhesions, differentiation and proliferation, important cellular activities preceding the osseointegration of implants^{8,9}.

There is a wide variety of surface morphologies reported in the literature affecting cellular activities, trying to mimic the biological microenvironment in the

sense to amplify and accelerate tissue mineralization and healing. By simple methods, chemical treatment procedures have been adopted to modify the surface of titanium alloys. Alpha and alpha plus beta alloys surfaces modified by phosphoric acid etching combined to alkaline treatment have potential for upregulating the expression of genes related to osteogenesis in human osteoblasts as investigated for Ti-cp, Ti-6Al-4V alloy and bioactivity on Ti-6Al-7Nb ultrafine grained¹⁰⁻¹².

Hydrophilic surfaces have been considered important for cellular adhesion, demonstrating selective protein adsorption, preferring fibronectin adsorption, which is more important for osteoblast adhesion than albumin, an anti-adhesion protein¹³. Super hydrophilic titanium modified surfaces have shown a strongly influence cells attachment and spread to the implant surface¹⁴.

Surface composition and ions release need to be well controlled having crucial importance to cell viability. The incorporation of cytotoxic elements has a detrimental influence for cell proliferation and viability while bioactive elements can improve cell attachment and viability¹⁵.

Regarding the rigidity of the material, the minimum possible value of Young's Modulus is preferable for titanium implants, condition found especially in beta titanium alloys, a body centered cubic crystalline structure phase. Obtaining materials with compatible levels of rigidity to the bone ($E = \sim 10 - 40 \text{ GPa}$) is strategic to prevent stress shielding, providing tissue dynamical regulation, preventing bone resorption and osteoporosis related events. Ti-15Mo presents high mechanical performance, chemical stability with Young's modulus reaching around 80 GPa, a reduced modulus when compared to Ti-6Al-4V-ELI alloys (110 GPa), a stiffer material, but widely used for intraosseous implants¹⁶.

For this study, one alpha (Ti-cp) and one beta phase (Ti-15Mo) alloys were surface modified by chemical treatments using acid followed by alkaline media. Alteration in surface topography by physical placement of grooves and depressions along titanium surfaces has been shown to influence cell orientation through contact guidance¹⁷. Surface alterations on morphology, chemistry, roughness, effective area and wettability were assessed to identify correlation between surface modification and cellular behavior on the substrates using rat bone marrow stem cell – RBMSC primary culture. Cell morphology, viability, gene expression and mineralized nodules formation were evaluated to look the influence of titanium alloy surface modification on cellular activities, including attachment, proliferation, differentiation and matrix mineralization.

Interesting results related to mechanisms of osteoinduction could be stimulate for the samples after surface treatments, especially Acbs treatments, comparing to US-machined condition. The findings highlight the importance to surface modify implant materials to improve the interface of materials and bone and osteogenic events.

Materials and Methods

Ti disc preparation

Commercially pure Ti discs (area: 122 mm²; thickness: 2 mm; Titanews Barueri, SP, Brazil) and Ti-15Mo alloy discs (area: 122 mm²; thickness: 2 mm; ATI Alvac, Monroe, NC, USA) were used in this study. All the discs were mechanically polished under water cooling using 100 to 600-grit grinding paper. Subsequently, the discs were ultrasonically cleaned (Ultramet 2003 Sonic Cleane, Buehler, Uzwil, Suíça), immersed for 15 min in acetone (Sigma Aldrich, St Louis, MO), 15 min in alcohol (Sigma Aldrich, St Louis, MO), 15 min in deionized water (Sigma Aldrich, St Louis, MO) and were dried at room temperature (25°C). One third of the discs was separated at

this stage for use as control samples which were called polished discs (US). The other part was subjected to chemical surface treatment with phosphoric acid (H_3PO_4), followed or not by alkaline treatment with sodium hydroxide (NaOH) and designated as Ac and Acbs disc, respectively.

The experimental surfaces were obtained by immersion in a beaker containing concentrated H_3PO_4 at $80^\circ C$ for half hour. The alkaline treatment in NaOH medium was carried out on the previously acid etched surfaces. Immediately after the acid treatment, the samples were immersed 10 minutes in deionized water and followed by 10 min in acetone. A polyethylene recipient containing 75 mL NaOH 10 mol L^{-1} of solution to each sample was used for the alkaline treatment and a heat controller was used to keep the alkaline medium at $60^\circ C$ during 24 h. Finally, previously to the *in vitro* tests, the US, Ac and Acbs discs were wrapped and sterilized with 25kGy gamma radiation (CBE, Cotia, SP, Brazil).

Surface characterization

The surface morphologies and semi-quantitative chemical composition of the samples described were observed by scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy – EDS (Philips XL30-FEG-SEM equipped with an Oxford Link ISIS 300 EDS). Roughness measurements were carried out with a confocal laser scanning microscope - CLSM (OLYMPUS LEXT OLS 3100). Water contact angle by sessile drop method was measured by mean of a KSV CAM200 tensiometer at room temperature.

Rat bone marrow stem cell – RBMSC primary culture

Rat bone marrow stem cell (RBMSC) were isolated from femurs of 15 to 21 day-old *Rattus Norvegicus Holtzman* rats following protocol approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation from the School of Dentistry at Araraquara - UNESP, in accordance with the CEEA - n° 34/14 for animal experiments (ANEXO A). The bone marrow contents were centrifuged and resuspended in 10 ml of minimum essential medium eagle (α -MEM), supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), penicillin 100 IU/mL and streptomycin 100 μ g/mL (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Cells were seeded in 100 mm culture dishes and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. After 24h, non-adherent cells were washed and medium was replaced every 3 days, until the cells reach, approximately, 80% confluence. Then, cells were harvested and frozen in FBS with 10% dimethylsulfoxide (DMSO) before the following experiments.

Biological analyses

Biological tests were performed to evaluate the behavior of rat BMSC seeded on the surface of six different titanium discs: Ti-cp and Ti-15Mo alloy, both with 3 different surface treatment: polished (US), Ac, Acbs. For all tests, discs samples were put in individual wells in a 24 wells-plate and 2×10^5 cells in 50 μ L of culture medium were seeded on discs surfaces (12 mm diameter). After 1 hour the volume of medium was supplemented to a final volume of 1000 μ l with α -MEM, supplemented with 10% fetal bovine serum, antibiotics (Penicillin 100 IU/mL and Streptomycin 100 μ g/mL), 2 mmol/L of ascorbic acid and 10 mM/L β -glycerophosphate, in an humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. The experiments were performed in triplicate.

a) Cellular morphology

The effects of the different surface treatment on cell morphology and spreading were evaluated by scanning electron microscopy analysis (SEM) after 3 and 7 days of incubation. Cells were fixed with glutaraldehyde 2% in pure α -MEM and glutaraldehyde 2% in 0,1M cacodylate buffer, washed in PBS and dehydrated in increasing concentrations of ethanol. After drying in a vacuum desiccator, samples received gold deposition by SCD 050 Sputter (Bal-Tec) at 50 seconds, current 40 mA with around 12 nm coverage. The stages of cellular spreading were determined in accordance with Rajaraman et al.¹⁸ (1974), using a FEI Magellan400L microscope.

b) Cellular adhesion and spreading

Cell adhesion and spreading were evaluated by direct fluorescence with Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), which labels ubiquitous actin cytoskeleton, and 4,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Molecular Probes), for nuclear staining. To assess the stage of adhesion and spreading at 1, 3, 7 and 14 days, cells were classified at stage 1 (round cells), 2 (round cells with filopodia), 3 (cells with cytoplasmic webbing), or 4 (well flattened cells) according to Rajaraman et al.¹⁸ (1974).

c) Cellular viability

AlamarBlue®, an important redox indicator, was used to evaluate cellular healthy and metabolic function. The effect of different surfaces and alloys on cell viability was evaluated by using the reagent after 3, 7 10, 14 and 21 days of cells culture. In each time point, cells seeded on the discs were incubated for 4 hours with 500 μ L of work solution (α -MEM with 10% FBS, Penicillin 100 IU/mL, Streptomycin 100 μ g/mL and 10% AlamarBlue®). After, 150 μ L of work solution from each sample were transferred to a 96 well-plate and read on a spectrophotometer at wavelengths of

570 and 600 nm. The number of viable cells was associated with the die reduction level and expressed as percentage of reduction of AlamarBlue®, according with the manufacturer's instructions.

d) RNA isolation and gene expression analysis

Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed to analyze the expression levels of the genes encoding alkaline phosphatase (ALPL), osteocalcin/bone gamma-carboxyglutamic acid protein (BGLAP), and transcription factor 7 (SP7) by cells in response to the Ti different surfaces. These experiments were conducted at 7 and 14 days.

Total RNA was extracted and quantified at each incubation time by utilizing RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Each sample was quantified by photometry and considered acceptable when the 260/280 nm absorbance ratio was higher than 1.8. The cDNA was synthesized from each RNA sample by the High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 300 ng of total RNA in a 20 µL reaction. The qPCR reactions for Alpl, Bglap, and SP7 were performed with TaqMan gene expression assays (Table 1) cDNA, and Taqman Universal Master Mix following the manufacturer's protocol (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Reactions were run in a Step One Plus real-time thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Relative levels of gene expression were performed using the cycle threshold method and normalized with the reference gene GAPDH.

Table 1 – Inventoried TaqMan gene expression assays used for real-time PCR analysis (Applied Biosystem).

Target gene	Assay ID	Amplicon lenght	Gene ID
ALPL	Rn 01516028_m1	68	25586
BGLAP	Rn 00566386_g1	104	25295
SP7	Rn_02769744_s1	76	300260
GAPDH	Rn_01775763_g1	174	24383

e) Mineralized nodule formation

For assessment of the amount of mineral deposited by the cultured cells, calcium content in the cell layer was quantified by the Alizarin red assay performed at day 21. The cells attached to the discs Ti-cp and Ti15Mo with different surface treatments were washed twice with HBSS at 37 °C and then fixed with 1 mL of ice cold 70 % ethanol for 1 hour at 4°C. The specimens were washed twice with deionized water and stained with 1 mL (40 mmol/L, pH 4.2) Alizarin red (Sigma-Aldrich) solution per disc at room temperature for 15 min under shelter and gentle shaking (VDRL Shaker, Biomixer, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The unincorporated dye was aspirated, the titanium discs were washed five times with deionized water to remove excess stain, and then mineralized nodules were photographed. Subsequently, mineralization was quantified by dissolving Alizarin red with 500 µL of 10 % cetylpyridinium chloride (Sigma-Aldrich) solution per well/disc for 15 min under gentle shaking at room temperature. Three aliquots of 100 µL of the stained solutions were transferred to wells of 96-well plates and read at 550 nm in a microplate reader (Power Wave XS, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), and the average of the three measurements was used for statistics representing one sample.

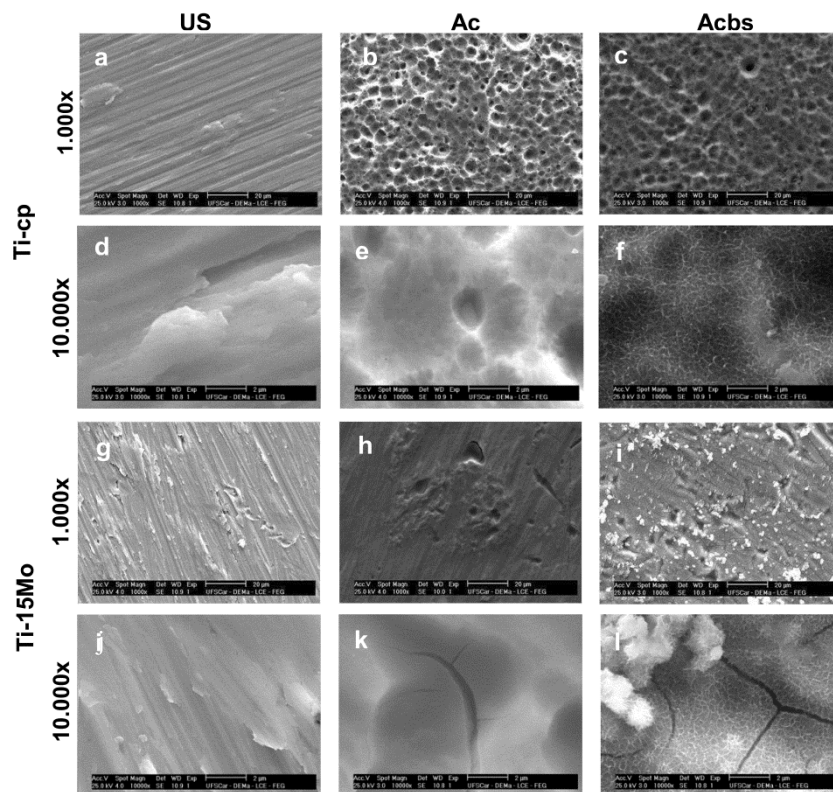
Results

1) Surface Characterization

Morphology

The Figure 1 illustrates discs surface morphology after different treatments observed by SEM. The surface wet-abraded with #600 SiC grit paper showed oriented grooves (images a/g), while the acid etching procedure produced homogeneous porosity on Ti-cp (image b) and few pores on Ti-15Mo surface (image h). After the alkaline treatment both materials presented a nano topographic formation, on the previously micro porous Ti-cp surface (image c) and over Ti-15Mo smoother one (image i) resulting in a nano topographic sponge-like surface.

Figure 1: Images of Ti-cp and Ti-15Mo surfaces after treatment with acid or alkaline acid, in 1000x and 10.000x magnification of SEM. (a/d) Ti-cp-US (polished), (b/e) Ti-cp-Ac (acid treatment), (c/f) Ti-cp-Acbs (alkaline acid treatment), (g/j) Ti-15Mo-US, (h/k) Ti-15Mo-Ac and (i/l) Ti-15Mo-Acbs.



Composition

Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) chemical microanalysis in the region equivalent to the images of Figure 1 (a,b,c,g,h,i) with 1000X magnification were carried out for all samples. Sodium incorporation after alkaline treatment and increased surface oxidation induced by acid etching were detected for Ti-cp and for Ti-15Mo alloys. Oxygen enrichment was detected for Ti-cp Acbs, Ti-15Mo Ac and Acbs because of the passive layer thickening induced by acid etching (Table 2).

Table 2: Percentage of semi-quantitative chemical elements determined by energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS) microanalysis on the different surfaces of the Ti-cp and Ti-15Mo discs.

Sample ID	Chemical elements (w%)			
	O	Ti	Mo	Na
Ticp - US	18.83	81.17	0	0
Ticp - Ac	21.42	78.58	0	0
Ticp - Acbs	62.78	31.90	0	5.32
Ti15Mo - US	21.73	71.91	6.36	0
Ti15Mo - Ac	57.13	39.38	3.49	0
Ti15Mo - Acbs	62.86	29.61	2.40	5.13

Roughness and Effective Area

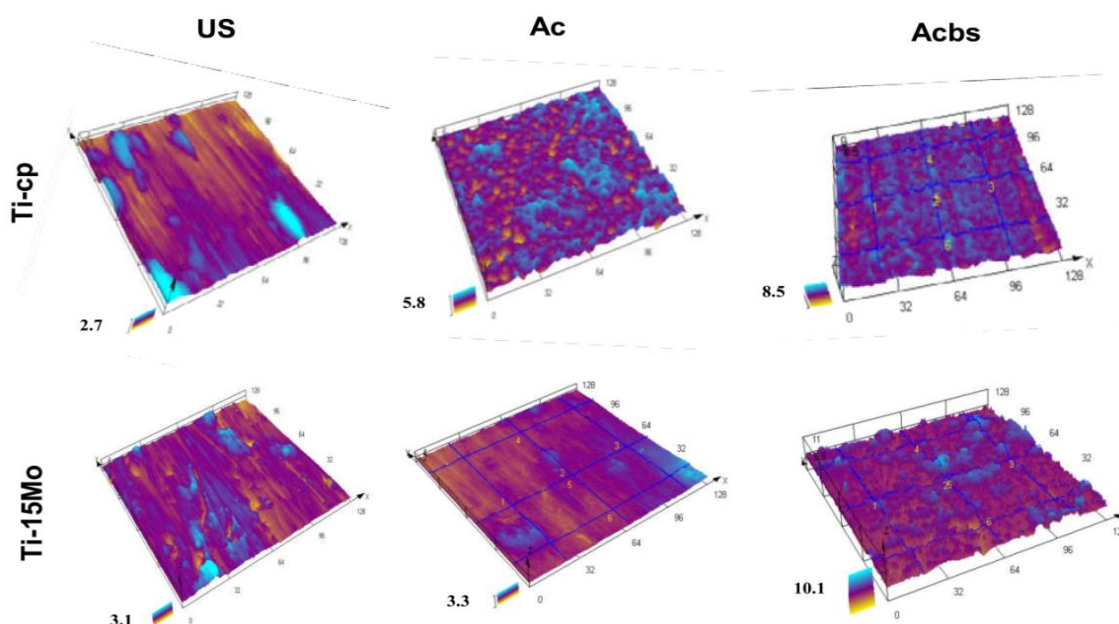
The surface roughness measurements were performed in triplicate in one direction and repeated in triplicate after turning the samples 90°. It was possible to observe a roughness-relation to the direction. A higher dispersion was observed for Ticp-US and Ti-15Mo-US, while for acid etched samples combined or not to the alkaline treatment the standard deviations were smaller, characterizing more homogeneity for all direction measurement.

Acid etching combined to alkaline treatment conditions presented an increased average roughness (R_a) for both alloys. Acid etching increased roughness only for Ti-cp samples. After alkaline treatment, Ti-cp previously acid etched presented an increased effective area owing to the nanotopographic formation. For Ti-15Mo alloy, the acid etching smoothed the surface but the alkaline treatment increased drastically the average surface roughness, doubling the compared effective area, as can be seen in Table 3 as well as in Figure 2, with 3-D image constructed by laser scanning confocal microscopy.

Table 3: Surface area of Ti-cp and Ti-15Mo samples and roughness parameters analyzed by laser scanning confocal microscopy.

Samples	Surface area -μm^2	R_a average	SD Ra	R_t average	SD Rt
Ticp - US	17.17	0,22	0,01	1,22	0,52
Ticp – Ac	22.99	0,57	0,09	4,38	0,64
Ticp – Acbs	32.07	0,53	0,07	3,54	0,36
Ti15Mo - US	18.10	0,20	0,06	1.62	0,54
Ti15Mo - Ac	17.92	0,14	0,06	1.15	0,25
Ti15Mo - Acbs	37.88	0,65	0,15	4.20	0,70

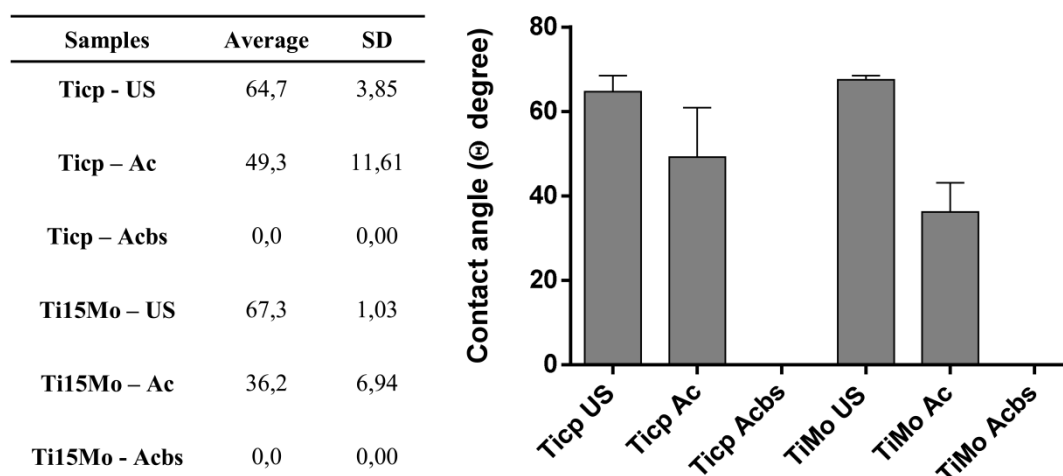
Figure 2: 3-D image constructed by laser scanning confocal microscopy show the surface roughness of Ti-cp and Ti-15Mo discs.



Wettability (contact angle measurements)

Wettability was affected by the different surface treatments in a similar way for both Ti-cp and Ti-15Mo alloys. Average of contact angle presented in Figure 3 shows that acid etching increased hydrophilicity compared to polished surfaces and alkaline treatment induced super-hydrophilic behavior ($\Theta=0^\circ$).

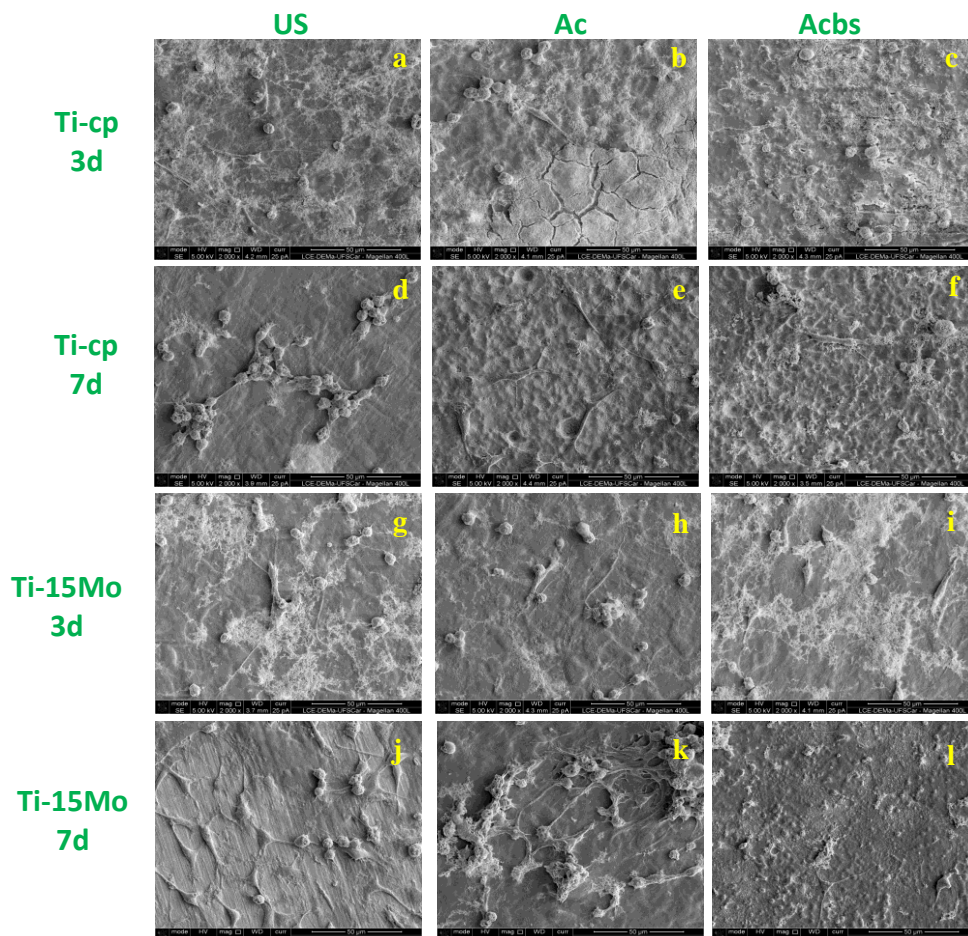
Figure 3: Contact angle test of Ti-cp and Ti-15Mo samples with their treatment surface



2) Biological Analyses

RBMSC cells cultured on Ti-cp and Ti-15Mo discs demonstrated similar spreading and morphological behavior (Figure 4). At 3 days, cells were in an initial stage of proliferation, having a rounded shape, recently adhered to surfaces. After the initial stage some cells showed stretches in their cytoskeleton, known as actin bundles and extensions named as lamellopodia. After, the cells exhibit small prolongations denominated filopodia, nanotopographic sensitive extensions produced by cells on substrates. After 7 days, a great number of cytoplasmatic prolongations were seen connecting to the roughness of the Ac and Acbs treated surfaces.

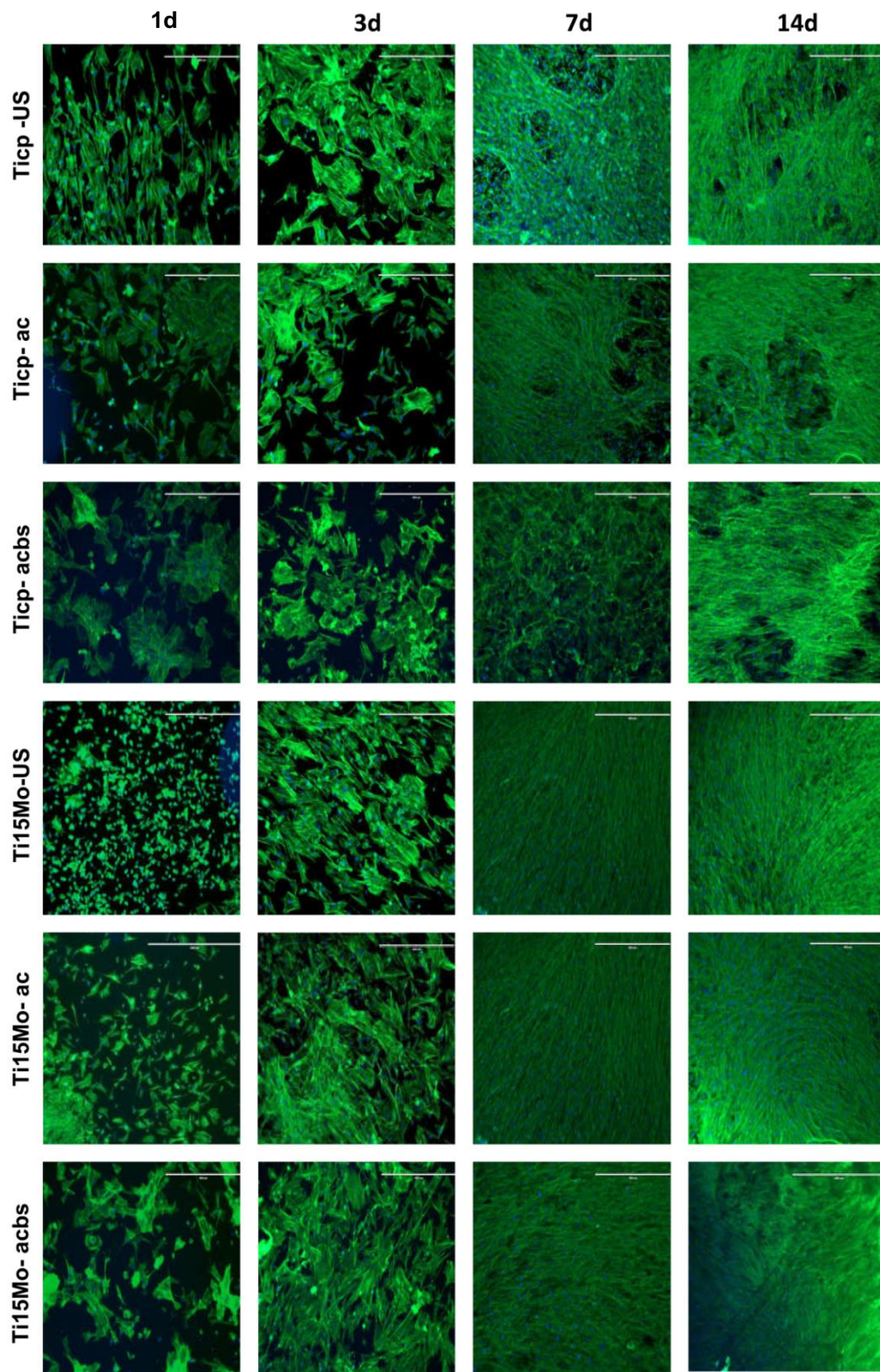
Figure 4: SEM images of cell spreading on the surfaces of Ti-cp and Ti15Mo: treatment with acid (Ac) or alkaline acid (Acbs), in 2000x magnification. (a/d) Ticip-US (polished), (b/e) Ticip-Ac (acid treatment), (c/f) Ticip-Acbs (alkaline acid treatment), (g/j) Ti15Mo-US, (h/k) Ti15Mo-Ac e (i/l) Ti15Mo-Acbs.



For Ti-15Mo alloy, the chemical treatments have provided more favorable substrates for cell growth compared to machined finishing surface (US), as shown in Figure 4.

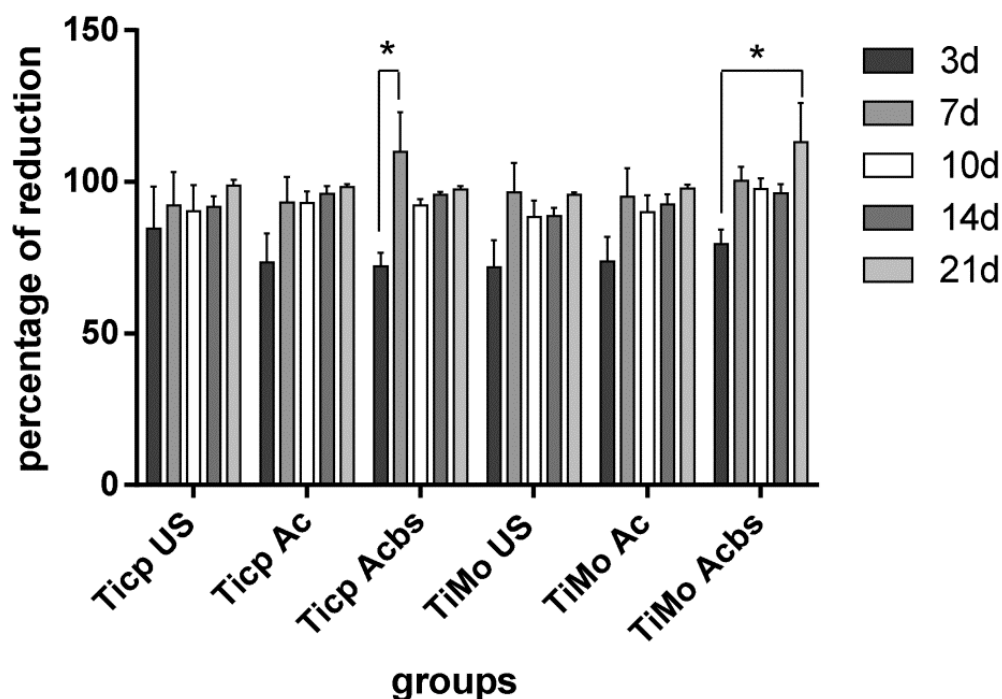
Direct Fluorescence microscopy sought to investigate the cellular adhesion and spreading on each surface sample from 1 to 14 days of cells culture (Figure 5). After 1 day, cell cultured on Ti-cp discs demonstrated a polygonal shape for all treatment condition while for Ti-15Mo there were some small rounded or polygonal cells for the control US and for Ac and Acbs conditions cells presented spreader and flat behaviors with the presence of cytoskeleton extensions, demonstrating a more advanced stage of development in comparison to the control discs. After 3 days, cells on Ti-cp or Ti-15Mo exhibited small cytoskeleton extensions for all the samples. After 7 days most of the cells had polygonal shape and were in confluence, forming a more homogeneous cell layer on Ti-15Mo discs.

Figure 5: Representative image from microscopy associated with direct fluorescence at 1, 3, 7 and 14 days of cell culture on Ti-cp and Ti-15Mo discs with the different surface treatments.



Cell viability based on Alamar Blue test for 3 to 21 days can provide indication for cell growth and increased metabolic activity. This system incorporates an oxidation-reduction (REDOX) indicator that both fluoresces and changes color in response to chemical reduction of growth medium resulting from cell growth and activity. There was no significant inter-group differences along all the period analyzed. The treatment Acbs presented an increased viability for Ti-cp at 7 days compared to 3 days and for Ti-15Mo at 21 days compared to 3 days in the intra-group comparison ($p < 0.05$). (Figure 6)

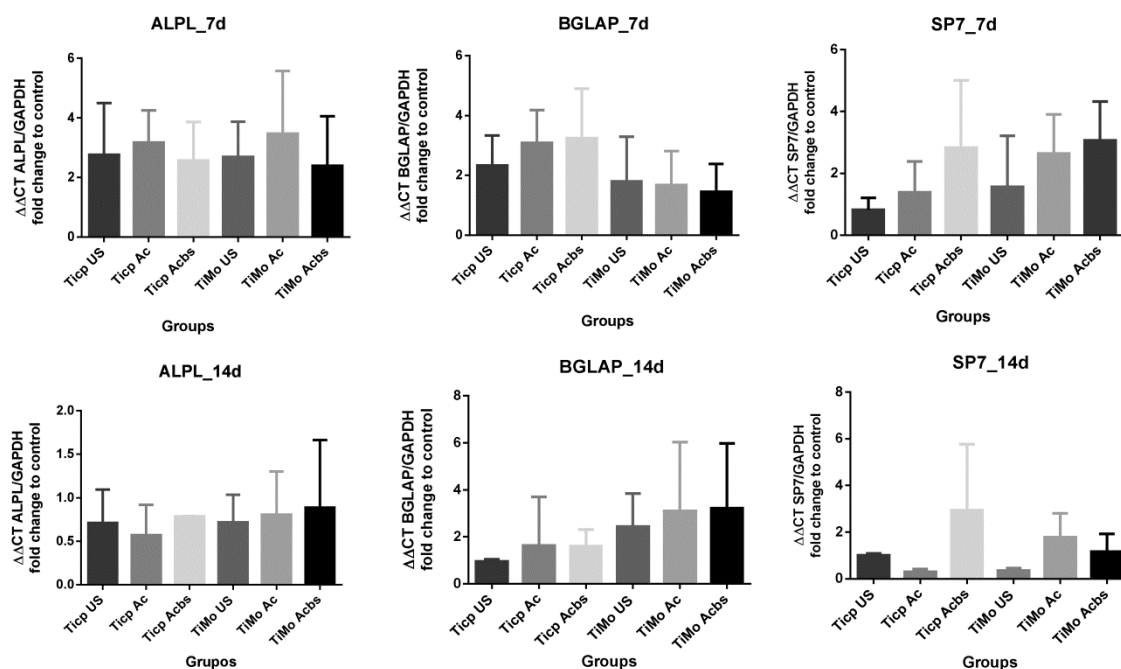
Figure 6: AlamarBlue[®] - Percentage of reduction related to the positive control (%) – inter and intra-group comparison in different periods from 3 to 21 days. (*statistical difference = $p < 0.05$).



Osteoblastic differentiation and maturation were investigated through gene expression analysis of different bone related markers, after 7 and 14 days of cell culture on different discs surfaces. Some assessed genes presented no significant difference in their expression, independently of the surface treatment and disc alloy. However, SP7

transcription factor, an important osteoblast marker and osteogenic signaling, presented at 7 and 14 days, a tendency of up-regulation for both treatments, Ac and Acbs, compared to machined surface condition (Figure 7). Associated to this, after 14 days, Ti-15Mo Acbs discs presented a tendency of ALPL up-regulation. Following the same trend, BGLAP, encoding osteocalcin, was increased for cells cultured on Ti-cp Ac and Acbs at 7 days and for Ti-15Mo Ac and Acbs at 14 days.

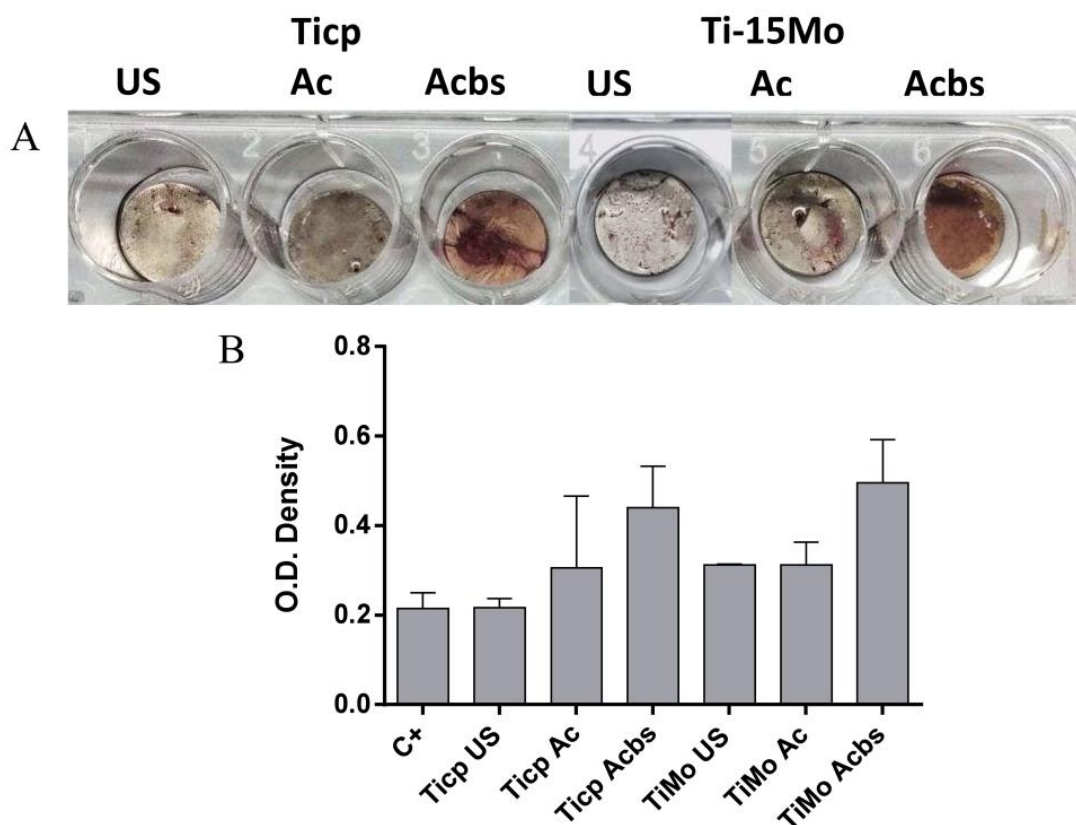
Figure 7: Gene expression of molecules related to osteoblastic phenotype in rat BMSC. Values are presented as fold-change of control (cells seeded on plastic surface). Cells were grown on different surfaces for 7 and 14 days. alkaline phosphatase (**ALPL**), bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein (**BGLAP**) and **SP7** transcription factor.



Finally, after 21 days of cell culture, surfaces presented bone mineralization nodules as shown by Red Alizarin red test, characterizing the presence of mature and active osteoblasts. The qualitative analysis has shown that cells cultured on surface

treated samples demonstrated a more pronounced effect when compared to machined surfaces (Figure 8A). After capturing images of the discs surfaces, the extraction and quantification of Red Alizarin were carried out, confirming the qualitative assumption, evidencing the increased extracellular matrix mineralization observed for Acbs treated surfaces in both Ti-cp and Ti-15Mo alloys (Figure 8B).

Figure 8: Alizarin red staining for mineralized nodule formation in osteoblast cells on Ti-cp and Ti-15Mo discs at 21days, with different surface treatment. A) representative images of mineralized nodules stained with alizarin in different surfaces. B) Quantitative analyzes of alizarin incorporated on extracellular matrix.



Discussion

The present study evaluated a new titanium alloy – Ti-15Mo – and the influence of chemical surface treatments on its physico-chemical characteristics and on osteogenic responses of rat BMSC cultured on disc samples. Ti-cp alloy was used as

control alloy. Phosphoric acid surface treatment increased roughness in both alloys, more severely on Ti-cp surfaces. This was already expected since Ti-15Mo alloy presents higher corrosion resistance¹⁹. Acbs treated surfaces presented a nanotopographic coating on the previously roughness induced by acid treatment for both alloys, as demonstrated by SEM images (Figure 2). Nanoengineered surfaces possess the unique capacity of directly affecting the molecular and cellular events that ultimately determine the overall biological response to an implanted material, such as protein adsorption, cell adhesion and proliferation among others²⁰.

Previous studies^{21,22} have reported roughness measurement for different surface treatments and an interval between 0.5 to 2.0 μm have been found for acid etching treated surfaces, values also observed in our study for both alloys after Acbs treatment. US samples, presented a slightly hydrophilic behavior (less than 70°), acid treatment resulted in a more hydrophilic interaction (50°) and in alkaline treated samples, a complete wetting could be noticed, characterizing a super hydrophilic surface (0°) for both alloys, after Acbs treatment. Some authors obtained contact angle around 70° (Kwon YD et al.²³ 2014) on magnesium-incorporated surfaces, the same result of our machined surfaces only, suggesting that the chemical treatments with Ac and Acbs in the present study significantly improved surfaces wettability. In a previous work¹², Ti-cp hydrophilic was reported even with higher values of contact angles than observed for the present study. Recently, Zhang et al.²⁴ (2016) reported contact angle values around 97° and 84° for acid etched surfaces. According to Spriano et al.²⁵ (2005), Ti-6Al-7Nb alloy obtained contact angle around 0° or 15° in samples treated with alkaline (NaOH) final treatment, depending on the atmosphere used for the heat treatment. Contact angles smaller than 30° have shown hydrophilicity and promising surface for implant inducing osseointegration²⁶.

The response of osteoblastic cells seeded on different titanium alloys has been shown to depend not only on the material composition but from its topography and energy features^{17,27,28}. Our results demonstrated that cells cultured on surface samples of Ti-cp and Ti-15Mo disc presented a similar spreading for both alloys. For Ti-15Mo after Ac treatment, effective cells growth and flat shape was observed. In addition, cytoskeleton extensions, lamellopodia and even filopodia could be observed, since the first day. After the seventh day of cell culture a polygonal shape could be observed by direct fluorescence microscopy. A more oriented cell alignment and pronounced cytoskeleton extensions could be noted to chemically treated surfaces, in accordance with previous observations (Brunette and Chehroudi, 1999²⁹). Similar characteristics were found by Uggeri et al.³⁰ (2010) suggesting that no toxic effect was observed in all the surfaces tested.

According to our findings, the surface treatments had little influence on cell viability, except for Acbs treatment which resulted in significant proliferation in later periods compared to 3 days data, for both alloys. Considering the increase in absorbance corresponds to the increase in the number of cells (Rampersad SN.³¹, 2012), it is possible to infer that the slight differences encountered can be attributed to small differences on proliferation of cells.

The influence of surface treatment on osteoblastic gene expression by cells cultivated on different substrates was demonstrated by real time PCR analysis. The Ac surface had greater influence on the expression of ALP at 7 days of cellular culture and this gene encodes the enzyme phosphatase alkaline, which is fundamental during mineralization stages exerted by osteoblastic cells, as indicative of calcification and differentiation (Stein GS et al.³², 2004). BGLAP acts in early stages of bone formation and were slightly upregulated in both periods on cells seeded on chemically treated

surfaces. The Acbs surface stimulated the expression of SP7 and BGLAP and similar findings were observed by Tillntson et al.³³ (2016) for hydrophilic surfaces, in accordance with Long F³⁴ (2012), that reported that in a late stage of cell differentiation SP7 is also expressed by osteoblastic cells. These findings demonstrate the influence of surface modification process to induce the differentiation of the marrow-bone stem cell to osteoblasts cells, an osteoinductive behavior can be stimulated by the surface medication, specially Acbs procedure.

Finally, to assess and quantify the presence of nodules of mineralization after 21 days of cell culture, Alizarin red staining was investigated to measure the formation of calcium enriched crystals, formed by rat MBSC. Chakravorty N et al.³⁵ (2012) observed that cells cultured on osteogenic differentiation media induced positive Alizarin red staining confirming that the primary alveolar bone-derived cell cultures contained efficient osteoprogenitor cells. In our study, the qualitative analysis confirmed the data obtained in the quantitative analysis, in which it detected that the cells grown on the surfaces that received treatment, especially the Acbs treatment, were more strongly stained when compared to the only machined surfaces. Other findings can corroborate our hypothesis suggesting that the development of roughness and nanotopographic surface structure can induce an important osteogenic activity^{36,37}.

Conclusion

The chemical treatments performed reached the objective of modify the physico-chemical characteristics of Ti-cp and Ti-15 Mo, so the events observed in the RBMSC suggested to favor osseointegration. The Ac treatment associated or not to the alkaline treatment (Acbs) suggested to be efficient for the process of osteoconduction, since the gene expression of proteins related to the osteogenesis processes were high in

these surfaces, confirming the influence of the topography obtained in nanoscale, more specifically on roughness and wettability, suggesting surfaces favorable for implant osseointegration. The chemical surface treatment accelerated chronological changes in cell morphology. The treatment Acbs suggested an increased cellular viability; furthermore cells cultured on Ti-cp Ac and Acbs surface treated were able to produce a higher quantity of mineralized material when compared to machined discs. No differences were found between the Ti-cp and Ti-15Mo alloys. Future studies are suggested to observe the advantages of acid and alkaline treatments in vivo to establish and prove the efficacy of osseointegration, as well as to create new perspectives in Implantology.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP – Sao Paulo Research Foundation - for grants (Proc. 2013/06258-0) and CAPES – Coordination for The Improvement of the Higher Education Personnel (n° 0571/2017) - that made this work possible.

References

1. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003; 67(8): 932-49.
2. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20 Suppl 4: 172-84.
3. Oliveira NT, Guastaldi AC. Electrochemical stability and corrosion resistance of Ti-Mo alloys for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2009; 5(1): 399-405.
4. Oliveira NTC, Aleixo G, Caram R, Guastaldi AC. Development of Ti–Mo alloys for biomedical applications: Microstructure and electrochemical characterization. *Mater Sci Eng A Struct Mater.* 2007; 452-453: 727-31.

5. Jones GE. Human Cell Culture Protocols: Methods in Molecular Medicine. *J Pharm Pharmacol.* 1996; 48:1332.
6. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science.* 2005; 310(5751): 1139–43.
7. Wang G, Moya S, Lu Z, Gregurec D, Zreiqat H. Enhancing orthopedic implant bioactivity: refining the nanotopography. *Nanomedicine (Lond).* 2015; 10(8): 1327–41.
8. Gardin C, Ferroni L, Favero L, Stellini E, Stomaci D, Sivoletta S et al. Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction. *Int J Mol Sci* 2012; 13(1): 737–57.
9. Sela J, Gross UM, Kohavi D, Shani J, Dean DD, Boyan BD et al. Primary mineralization at the surfaces of implants. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(4): 423–36.
10. Oliveira DP, Palmieri A, Carinci F, Bolfarini C. Osteoblasts behavior on chemically treated commercially pure titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2014; 102(6): 1816–22.
11. Oliveira DP, Palmieri A, Carinci F, Bolfarini C. Gene expression of human osteoblasts cells on chemically treated surfaces of Ti–6Al–4V–ELI. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015; 51: 248–55.
12. Oliveira DP, Prokofiev E, Sanches LFR, Polyakova V, Valiev RZ, Botta WJ et al. Surface chemical treatment of ultrafine-grained Ti–6Al–7Nb alloy processed by severe plastic deformation. *J. Alloys Compd.* 2015; 643: S241–S245.
13. Freitas SMR. Albumin and fibronectin adsorption and osteoblast adhesion on titanium oxides [tese de doutorado]. Porto: Universidade do Porto; 2007.

14. Wei J, Igarashi T, Okumori N, Igarashi T, Maetani T, Liu B et al. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater.* 2009; 4(4): 045002. doi: 10.1088/1748-6041/4/4/045002.
15. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Bioactive metals : preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15(2): 99–107.
16. Almeida A, Gupta D, Loable C, Vilar R. Laser-assisted synthesis of Ti-Mo alloys for biomedical applications. *Mater Sci Eng C.* 2012; 32(5): 1190–95.
17. Oliveira NTC, Perrotti V, Palmieri A, Guastaldi AC, Pellati A, Scapin CL et al. In vitro analysis with human bone marrow stem cells on Ti-15Mo alloy for dental and orthopedic implants application. *J Osseoint.* 2011; 1(3): 10-6.
18. Rajaraman R, Rounds DE, Yen SP, Rembaum A. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp Cell Res.* 1974 Oct; 88(2):327-39.
19. Kumar S, Sankara Narayanan TNS. Corrosion behaviour of Ti–15Mo alloy for dental implant applications. *J Dentistry.* 2008; 36: 500-7.
20. Variola F, Brunski JB, Orsini G, Oliveira PT, Wazen R, Nanci A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: State-of-the art and perspectives. *Nanoscale* 2011;3:335–53.
21. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007; 23(7): 844-54.
22. Massaro C, Rotolo F, De Riccardis F, Milella E, Napoli A, Wieland M et al. Comparative investigation of the surface of commercial titanium dental implants. Part 1: chemical composition. *J Mater Sci Mater Med.* 2002; 13:535–48.

23. Kwon YD, Lee DW, Hong SO. Magnesium vs. machine surfaced titanium - osteoblast and osteoclast differentiation. *J Adv Prosthodont.* 2014; 6:157-64.
24. Zhang CX, Falentin-Daudre C, Migonney V. Titanium alloy surface coatings using poly(sodium styrene sulfonate) and poly(acrylic acid). *Biomed Mater Eng.* 2016; 27(6): 657-68.
25. Spriano S, Bosetti M, Bronzoni M, Vernè E, Maina G, Bergo V et al. Surface properties and cell response of low metal ion release Ti-6Al-7Nb alloy after multi-step chemical and thermal treatments. *Biomaterials* 2005; 26(11): 1219-29.
26. Oshida Y. Titanium material implants. US Patent No. 6183255, 2001.
27. Wall I, Donos N, Carlqvist K, Jones F, Brett P. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Bone.* 2009; 45(1): 17-26.
28. Elias CN, Oshida Y, Lima JH, Muller CA. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2008; 1(3): 234-42.
29. Brunette DM, Chehroudi B. The Effects of the Surface Topography of Micromachined Titanium Substrata on Cell Behavior in Vitro and in Vivo. *J Biomech Eng.* 1999; 121(1): 49-57.
30. Uggeri J, Guizzardi S, Scandroglio R, Gatti R. Adhesion of human osteoblasts to titanium: A morpho-functional analysis with confocal microscopy. *Micron.* 2010; 41(3): 210-9.
31. Rampersad SN. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors (Basel).* 2012, 12(9): 12347-60.

32. Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A et al. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*. 2004; 23(24): 4315–29.
33. Tillotson N, Logan N, Brett P. Osteogenic stem cell selection for repair and regeneration. *Bone Rep*. 2016; 28(5): 22–32.
34. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13(1): 27-38.
35. Chakravorty N, Ivanovski S, Prasadam I, Crawford R, Oloyede A, Xiao Y. The microRNA expression signature on modified titanium implant surfaces influences genetic mechanisms leading to osteogenic differentiation. *Acta Biomater*. 2012; 8(9): 3516-23.
36. Ward BC, Webster TJ. The effect of nanotopography on calcium and phosphorus deposition on metallic materials in vitro. *Biomaterials*. 2006; 27(16): 3064-74.
37. Choi CR, Yu HS, Kim CH, Lee JH, Oh CH, Kim HW et al. Bone cell responses of titanium blasted with bioactive glass particles. *J Biomater Appl*. 2010; 25(2): 99-117.

3.2 Publicação 2

“Comportamento de células ósseas em superfícies de titânio-molibdênio tratadas com laser associado à deposição de apatitas”*

Florian F¹, Cominotte MA¹, Guastaldi FPS¹, Guastaldi AC², Cirelli JA¹

(1) Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Periodontia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Araraquara, São Paulo, Brasil.

(2) Grupo de Biomateriais – Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Química de Araraquara, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Resumo

Com o desenvolvimento de novas ligas metálicas na reabilitação oral por meio dos implantes dentários, os diversos tratamentos de suas superfícies têm sido o objetivo das pesquisas na Implantodontia. A proposição desse trabalho foi caracterizar uma superfície com modificações de superfície por irradiação a laser associada à deposição de apatitas, associada à avaliação da resposta in vitro de osteoblastos. A caracterização da topografia e composição físico-química foi realizada por meio dos testes de microscopia eletrônica de varredura (MEV) associada à espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) e ângulo de contato. Além disso, foi avaliada a resposta das células ósseas à essas superfícies observando a morfologia, adesão, proliferação e citotoxicidade celular, expressão gênica de marcadores da osteogênese e avaliação de formação de fosfatase alcalina. Os resultados da morfologia de superfície por meio da MEV/EDS demonstraram depósitos de cristais de HA nas ligas de Ti, contendo elementos O⁺, Ca⁺ e P⁺ após tratamento com laser + hidroxiapatita (LAP), o que parece ter favorecido a redução do ângulo de contato e ao crescimento celular pela maior área de contato criada pela estrutura de HA. Nas superfícies tratadas, somente é

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

possível visualizar a proliferação celular, sem evidenciar seu estágio morfológico pelas irregularidades da estrutura de HA. Houve diferença estatística na comparação intra-grupos da avaliação de proliferação e citotoxicidade, na qual o período de 3 dias teve diferença com 9d, 15d e 18d para liga Ti-cp-LAP e com 15d, 18d e 21d para liga Ti-15Mo – LAP ($p < 0,05$). A atividade de ALP apresentou maiores valores na liga Ti-15Mo no período de 10 dias com relação aos 14 dias de cultura. A expressão gênica de ALPL foi estimulada positivamente para as células do disco Ti-15Mo-US, mantendo seus valores até os 14 dias. Para o fator de transcrição RUNX2, os períodos iniciais de cultura foram mais favoráveis para expressão desse fator de transcrição, assim como para expressão relativa do mRNA do gene BGLAP, no qual foram estimulados positivamente em relação ao controle.

Introdução

Na Implantodontia, o titânio tem sido o material de escolha na fabricação de implantes osseointegráveis por permitir um contato direto entre tecido ósseo e o implante, além de apresentar propriedades biomecânicas capazes de suportar cargas mastigatórias¹, fator necessário para o sucesso do biomaterial e longevidade do tratamento proposto.

Atualmente, um dos desafios da implantodontia é acelerar o crescimento de tecido ósseo ao redor do implante. Assim, uma maneira de reduzir o tempo e aumentar a qualidade da osseointegração é modificando as principais propriedades da superfície dos implantes (mecânicas, topográficas ou físico-químicas)². O aperfeiçoamento do material utilizado para fabricação dos implantes visa resistência mecânica, a corrosão e desgaste, buscando desenvolver implantes cada vez mais eficazes^{1,3}.

O molibdênio é um dos elementos capazes de estabilizar a fase β do titânio e confere a liga Ti-15Mo uma indicação adequada para utilização em Implantodontia^{4,5}. Pesquisadores publicaram em 2009 que as ligas de Ti-6Al-4V irradiadas com laser tiveram uma melhora nas características topográficas e químicas da superfície, bem como espraiamento regular de células osteoblasticas⁶.

De acordo com Gaggl et al⁷ (2000) durante a caracterização físico-química das superfícies de implantes, por meio da MEV, foi encontrada uma maior pureza e rugosidade suficiente para osseointegração em superfícies de implante tratadas com laser, em comparação a outros tratamentos de superfície⁷. A hidroxiapatita (HA) é o principal componente mineral dos ossos e por isso é hoje um composto a base de cálcio e fosfato (CaP) tão estudado como biocerâmica. A combinação da biocompatibilidade da HA e as propriedades das ligas de titânio apontam um potencial para aplicações na área biomédica^{8,9,10}. Os substratos contendo revestimento de CaP apresentam uma fixação biológica mais rápida entre os implantes e tecido ósseo quando comparado com aqueles sem CaP^{11,12}.

Os estudos de Chang et al¹³ (1999) demonstram que os revestimentos de hidroxiapatita em titânio foram alterados pela interação com meio de cultura e a interação celular às superfícies de HA foi superior à das superfícies de titânio, confirmando propriedades que favorecem a osseointegração com HA. Este estudo implica que a interação ativa de HA com tecido vivo desempenha um papel importante na resposta celular inicial a este material.

Os vários estudos mostrados até agora demonstram a superioridade das diversas modificações superficiais específicas no que diz respeito às propriedades físicas, químicas e biológicas. Contudo, estudos que traduzem esses dados iniciais até chegarem ao comparativo do desempenho clínico dos implantes são escassos. Segundo Smeets et al¹⁴ (2016) ao se pensar no desenvolvimento de implantes a partir de ligas em estudo, deve-se atentar para promoção do melhor recrutamento, adesão e proliferação de células osteogênicas, garantindo a longo prazo o sucesso dos implantes.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi caracterizar a superfície da liga Ti-15Mo modificadas por laser associadas ao revestimento por apatitas e avaliar comparativamente o mecanismo biológico da interação de células ósseas, avaliando a adesão celular, proliferação e viabilidade e o potencial da superfície para estimular a osteogênese.

Materiais e Métodos

Obtenção das amostras em Ti15Mo e Ti-cp

As amostras utilizadas nessa pesquisa foram discos de 10 mm x 2 mm de Ti-15Mo confeccionados pelo Laboratório de Biomateriais do IQ-UNESP e de Ti-cp grau 2 fabricados pela empresa Titanews (Barueri-SP).

Tratamento das superfícies

Os tratamentos das superfícies foram realizados no Laboratório de Biomateriais do IQ-UNESP com 2 tipos de superfícies para cada liga: polida e irradiada com laser de alta potência associada a deposição biomimética de apatitas. As superfícies polidas receberam tratamento em uma politriz elétrica, com série gradual de lixas, sendo a última uma lixa de granulação 600. Ao término da usinagem, as amostras foram lavadas numa sequência de banhos com acetona, álcool etílico e água deionizada, sob vibração do ultrassom (Ultramet 2003 Sonic Clean, Buehler, Uzwil, Suíça) durante 10 minutos em cada etapa. Depois as amostras foram secadas naturalmente e armazenadas em embalagens para esterilização.

A irradiação a laser foi feita em um laser pulsado Yb:YAG Omni Mark 20 F (Ominitek Tecnologia Ltda, São Paulo, Brasil) em uma frequência de 20 Hz e potência de 140 W, após o polimento. Para deposição de apatitas realizada após a irradiação a laser, foi utilizado o método biomimético descrito por Aparecida et al.¹⁵ em 2009, utilizando a solução SBF modificada, composta de NaCl, NaHCO₃, K₂HPO₄, HCl, CaCl₂.2H₂O e TRIS, visando a deposição de diversos tipos de apatitas.

Todas as amostras foram enviadas a Companhia Brasileira de Esterilização (Jarinu-SP) para esterilização com radiação gama.

Caracterização das superfícies

A caracterização das superfícies foi realizada por meio da avaliação da composição química, topografia e energia de superfície (molhabilidade) das diferentes superfícies. Para isso os testes realizados foram: microscopia eletrônica de varredura (MEV) associada a Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) e Ângulo de contato.

a) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) associada a Espectroscopia por energia dispersiva de raios x (EDS):

A topografia foi realizada com o microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por efeito de campo (MEV-FEG- Field Emission Gun) e acoplado a ele um sistema de EDS, para determinação da composição química qualitativa e semi-quantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos (JEOL modelo 7500F equipado com Oxford Link ISIS 300 EDS). Essa etapa foi realizada no laboratório de Microscopia Eletrônica por Varredura de alta resolução, situado no IQ-UNESP.

b) Ângulo de contato:

A medida do ângulo de contato de uma gota de um líquido de interesse sobre uma superfície tem sido usada para caracterizar a molhabilidade da mesma. Esta propriedade é descrita como um dos fatores determinantes da osseointegração¹⁶.

Todas as amostras foram caracterizadas com relação à molhabilidade de suas superfícies com água, ou seja, foram caracterizadas quanto à hidrofiliicidade com auxílio de um goniômetro (KSV CAM200). O ângulo de contato foi obtido usando o método de gota séssil, para cada amostra foi realizada uma média de três medidas com gotas de água deionizada, contendo volume aproximado de 4 µL cada gota (Milipore) sobre a superfície. A medida do ângulo de contato corresponde à média do ângulo formado no lado esquerdo e do lado direito de cada amostra. Foi utilizado um medidor baseado em vídeo Dataphysics[®] (modelo OCA-15) controlado por software, situado no IQ-UNESP.

Estudo biológico

O presente estudo avaliou o comportamento de células osteoblásticas de cultura primária semeadas em quatro tipos de amostras. Assim, duas amostras de Ti-cp: uma polida (Ti-cp-US) e 1 modificada por laser com deposição biomimética de apatitas (Ti-cp-LAP), e duas amostras da liga Ti-15Mo: uma polida (Ti-15Mo-US) e uma modificada por laser com deposição biomimética de apatitas (Ti-15Mo-LAP).

Para todos os testes, 2×10^4 células foram semeadas sobre os discos em 50 µL de meio de cultura e após o período inicial de adesão de 4h o volume do meio foi completado para o volume final de 1000 µL. As células foram cultivadas em poços individuais nas placas de 24 poços, incubadas em meio de cultura α -MEM, 10% de soro

fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de streptomicina, 50 µg/mL de ácido ascórbico e 10 mM de β-glicerofosfato, a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Células ósseas foram obtidas por meio da técnica de cultura primária da medula óssea de ossos longos de ratos no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara–UNESP, conforme protocolo descrito brevemente a seguir e aprovado pelo Comitê Ético para Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara, obtido para todos os métodos descritos neste estudo (Protocolo 34/2014 – ANEXO A).

Foram utilizados ratos *Rattus Norvegicus Holtzman*, de 15 a 21 dias, com peso inicial de aproximadamente 80 gramas. Após anestesia com Ketamina (0,08 mL. 100 g⁻¹) e Xilazina (0,04 mL. 100 g⁻¹), os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico. Em seguida, foi feita a dissecação de fêmur e tíbia bilateral, seguido da lavagem da parte interna desses ossos com α-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. O conteúdo da medula óssea foi então centrifugado a 300G por 5 minutos em temperatura ambiente. As células (RBMSC) foram ressuspensas em 10 mL de α-MEM com 10% de FBS e 100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina para cada osso longo e, então semeadas em placas de cultura de 100mm e cultivadas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após 24h foi feita a troca do meio de cultura para remoção das células não aderidas intercalando-se, após isso, a troca de meio de 3 em 3 dias, até que as células estivessem a uma confluência em torno de 80%, para serem congeladas em FBS com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) ou então fazer o repique das mesmas, segundo a necessidade.

a) Morfologia celular:

Os efeitos das diferentes superfícies na morfologia e espraiamento celular foram avaliados por meio da MEV nos períodos de 3 e 8 dias. As células foram cultivadas sobre os discos, e então fixadas com solução de glutaraldeído a 2 % (Sigma) em α-MEM puro (Gibco) e glutaraldeído a 2% (Sigma) em tampão cacodilato 0,1M (Sigma), lavadas em PBS e desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico. Após secagem em dissecador a vácuo as amostras receberam deposição de ouro no Metalizador SCD 050 (Bal-Tec) no tempo de 50 segundos, corrente de 40 mA, com

cobertura de 12 nm. Os estágios de adesão e espraiamento foram determinados de acordo com o proposto por Rajaraman et al.¹⁷ (1974).

b) Adesão celular:

A adesão e espraiamento celular foram avaliados por fluorescência direta com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), que marca o citoesqueleto de actina e dihidroclorato de 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Molecular Probes) para marcação nuclear. Para avaliar o estágio de adesão e espraiamento celular em 3, 8 e 15 dias, de acordo com Rajaraman et al.¹⁷ (1974), as células foram classificadas no estágio 1 (células redondas), 2 (células redondas com filopódios), 3 (células com cinturas citoplasmáticas) e 4 (células bem achatadas).

c) Viabilidade e proliferação celular:

O efeito das diferentes superfícies e ligas na viabilidade celular foi avaliado pelo uso do kit Alamar Blue[®] (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, USA), sendo o reagente utilizado nos períodos de 3, 9, 15, 18 e 21 dias. A vantagem desse teste é a possibilidade do uso da mesma amostra nos diferentes períodos, o que leva a um resultado mais preciso.

As células juntamente com os discos foram incubadas em uma placa de 24 poços, contendo 500 µL da solução de trabalho do Alamar Blue (α -MEM com 10% de FBS, 1% de P/S e 10% de Alamar Blue) e como controle negativo a solução de trabalho do Alamar Blue. Após o tempo de incubação de 4 h, alíquotas de 150 µL foram coletadas de cada amostra, transferidas para uma placa de 96 poços e lidas em um espectrofotômetro em comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O número de células viáveis está relacionado com o nível de redução de corante e é expresso em percentual de redução do Alamar Blue, de acordo com o protocolo do fabricante.

d) Atividade da fosfatase alcalina:

A fosfatase alcalina (ALP) é um importante marcador de mineralização. As proteínas foram extraídas inicialmente de cada poço adicionando-se 1 mL/poço de Triton-X 100 a 0,05% (*Sigma*). Para avaliar o quanto as superfícies influenciam no processo de mineralização, a atividade da ALP foi avaliada pelo kit Fosfatase Alcalina

utilizado segundo orientações do fabricante (Labtest Diagnostica) nos períodos de 10 e 14 dias, períodos esses definidos em estudo piloto. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo total de proteína que foi determinado pelo kit de quantificação de proteína baseado no método de Lowry (Sigma), também segundo orientações do fabricante.

e) Análise da expressão gênica de proteínas indicadoras de diferenciação osteoblástica:

A diferenciação das células mesenquimais das culturas foi determinada pela expressão gênica dos marcadores de osteogênese utilizando o kit RT² PCR Array Human osteogenesis (SA Bioscience, Qiagen) em PCR Tempo Real (Step-One Plus, Applied Biosystem). Após períodos de incubação de 7 e 14 dias, o RNA total das células foi extraído com RNeasy Mini Kit (Qiagen). Em seguida, o cDNA foi obtido por meio do High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem), sendo que cada amostra foi quantificada (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e considerada aceitável quando a razão de absorvância de 260/280 nm era superior a 1,8.

A reação de PCR em Tempo Real foi realizada pelo sistema Taq-Man utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem) e primers pré-fabricados e testados pela mesma empresa (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystem).

Tabela 1 - Primers utilizados para PCR tempo – real (TaqMan qPCR master mix, Applied Biosystem).

Primers	cód	Amplicon lenght	Gene ID
ALPL	Rn 01516028_m1	68	25586
BGLAP	Rn 00566386_g1	104	25295
RUNX2	Rn_01512298_m1	86	367218

Fonte: Elaboração própria

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism v.5 (La Jolla, San Diego, Califórnia, USA). Para comparações de três ou mais grupos será utilizado o teste para dados não paramétricos, Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn; e para as comparações entre dois grupos será utilizado o teste para dados não paramétricos Mann-Whitney. O nível de significância adotado é de 5%.

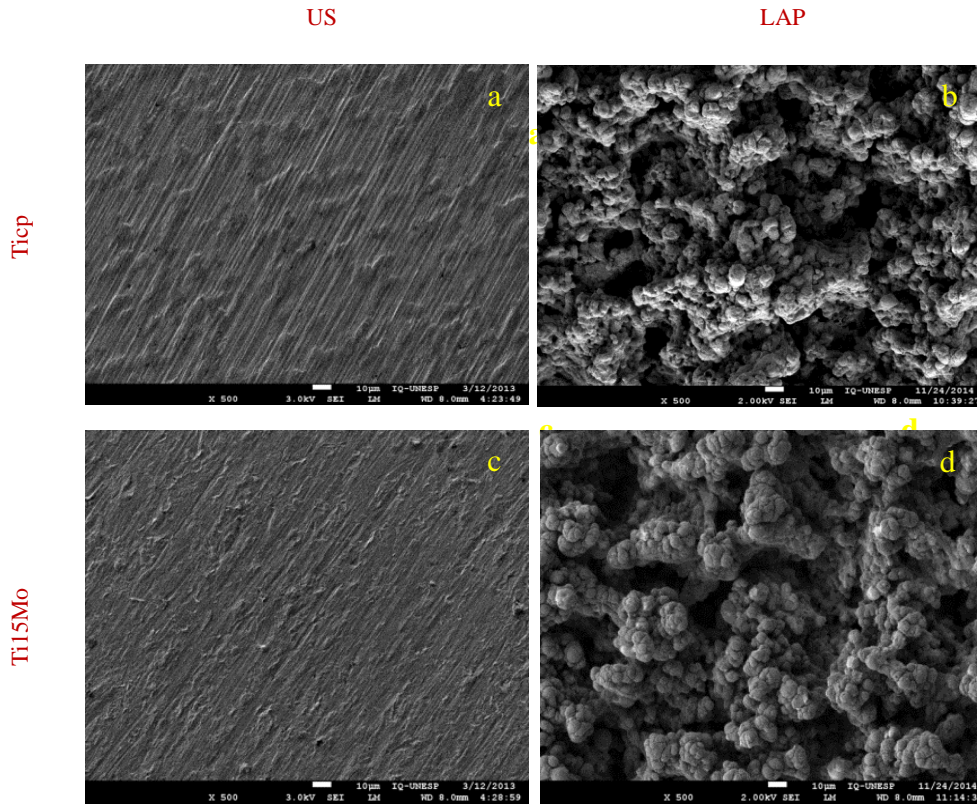
Resultados

Caracterização das superfícies

Os diferentes padrões de morfologia de superfície foram analisadas com microscopia eletrônica de varredura (MEV), como pode ser observado na Figura 1, que demonstram a abrasão superficial com lixas de SiC # 600 apresentaram ranhuras orientadas (itens a / c), enquanto o processo de aplicação de laser associado a deposição de apatitas (LAP) (itens b / d) produziu porosidades nas ligas de Ti com depósitos de cristais de HA.

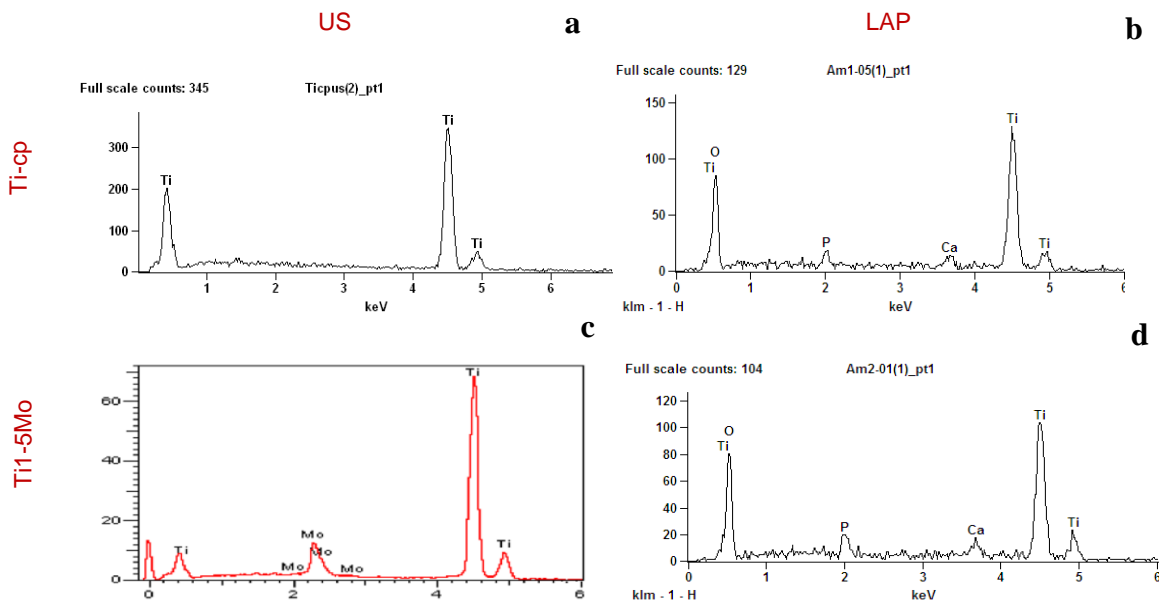
A microanálise de espectroscopia de raios X dispersiva de energia (EDS) na região equivalente à imagem da Figura 1 com ampliação de 1000X foi realizada para todas as amostras e a composição química foi avaliada (Figura 2). Os elementos Ti (a) e Ti + Mo (c) foram detectados para ligas de titânio (US) e foi observado enriquecimento de O^+ , Ca^+ e P^+ para Ti-cp e Ti-15Mo após tratamento com laser + hidroxiapatita (LAP).

Figura 1 - Imagens da avaliação das superfícies Ticp e Ti15Mo somente polidas ou após tratamento com laser + apatitas, com magnificação de 500x no MEV. (a) Ticp-US, (b) Ticp-LAP, (c) Ti15Mo-US, (d) Ti15Mo-LAP.



Fonte: Elaboração própria

Figura 2 - Análise EDS das imagens representativas da avaliação das superfícies de Ti-cp e Ti-15Mo e seus respectivos tratamentos de superfície.

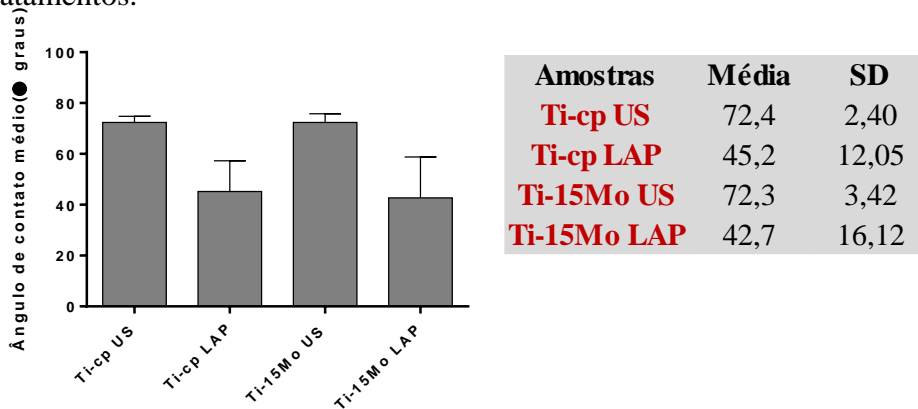


Fonte: Elaboração própria

Medida de ângulo de contato

Os tratamentos de superfície induziram diferentes parâmetros de molhabilidade na superfície das ligas Ti-cp e Ti-15Mo. A modificação da superfície pela aplicação de laser associado a deposição de apatitas (LAP) reduziu o ângulo de contato em comparação com superfícies somente usinadas (US). Os resultados da média de ângulos de contato para cada amostra, bem como o desvio padrão (SD), realizados em triplicata, podem ser observados na Figura 3.

Figura 3 - Ângulo de contato obtido das amostras Ti-cp e Ti-15Mo com seus respectivos tratamentos.



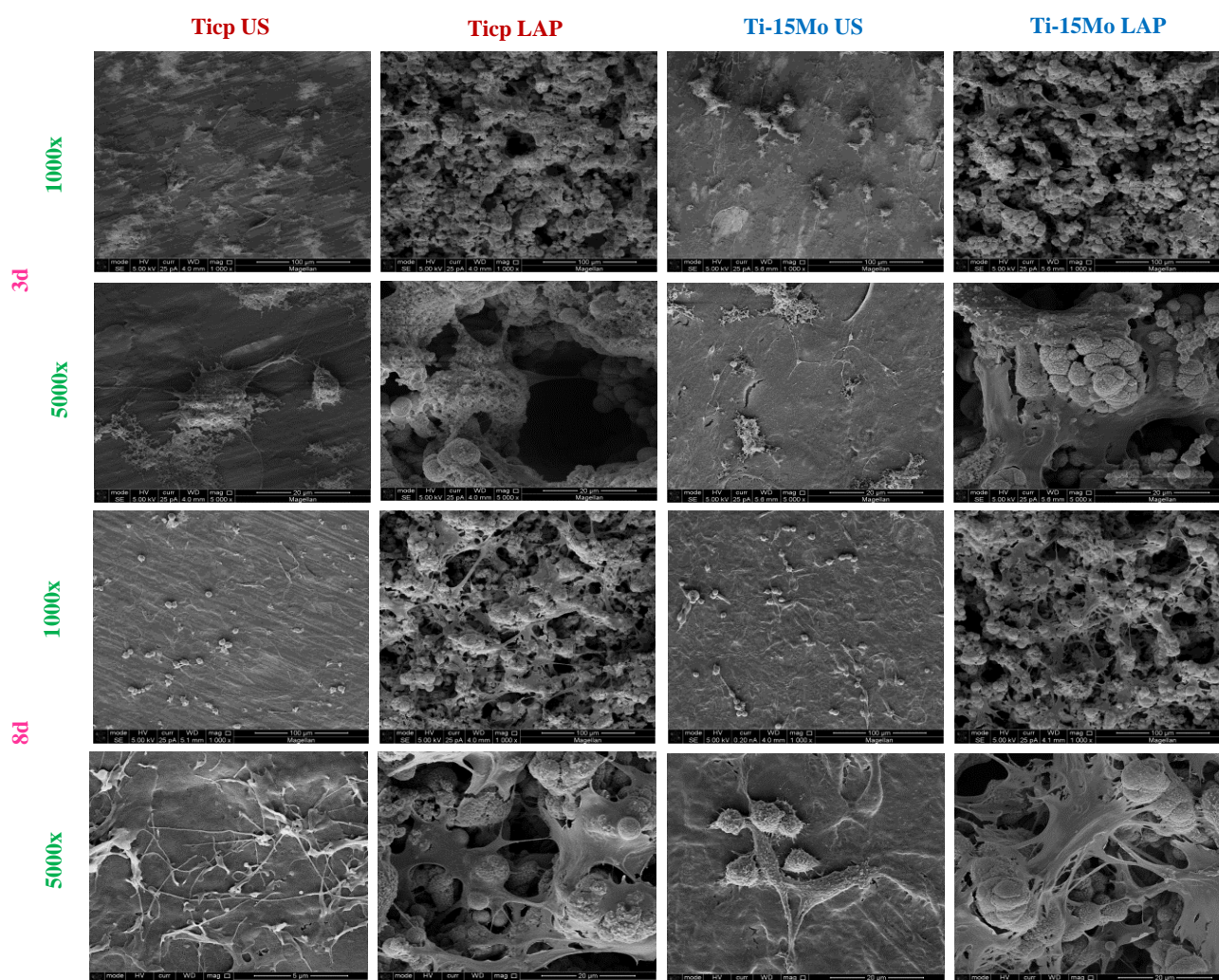
Fonte: Elaboração própria

Caracterização celular

As células RBMSC cultivadas na superfície dos discos usinados (US) de Ti-cp e Ti-15Mo demonstraram espalhamento celular similar entre si no período de 3 dias, na qual as células se encontram em estágio inicial de proliferação, com formato arredondado e aderidas na superfície. Algumas demonstram formato alongado, emitindo seus primeiros prolongamentos, denominados filopodias. No período de 8 dias, as células já se apresentaram em maior número e mais prolongamentos, formando aglomerados.

Nas superfícies tratadas com laser + hidroxiapatita (LAP), o tratamento parece favorecer o crescimento celular, comparado às células da superfície usinada (US). Ocorre maior área de contato celular criada pela estrutura da hidroxiapatita na qual os prolongamentos celulares se unem com o passar do tempo, formando uma estrutura celular tridimensional (Figura 4).

Figura 4 - Morfologia celular observada por MEV em 3 e 8 dias, magnificação de 1000 e 5000x.



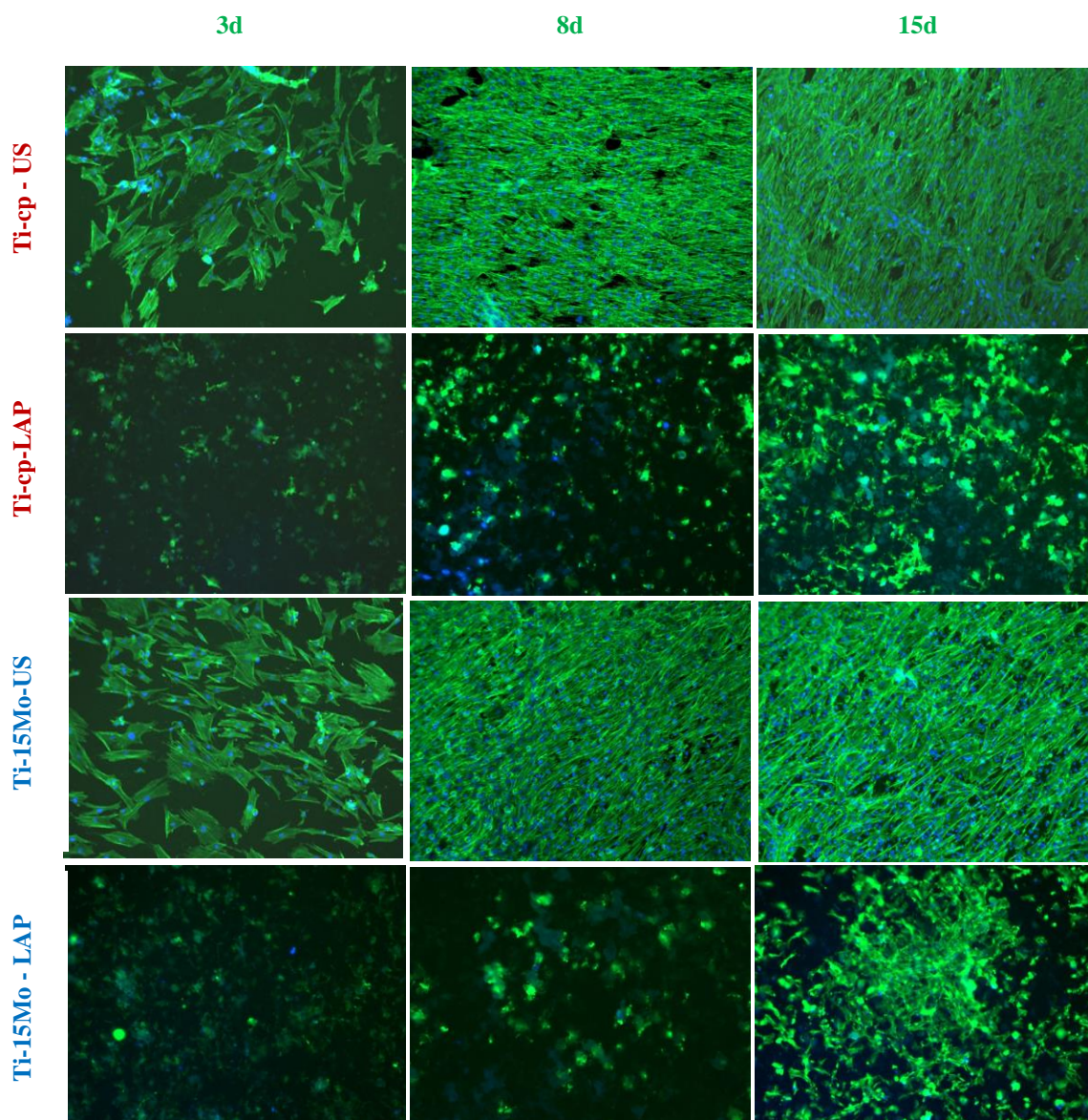
Fonte: Elaboração própria

A microscopia associada à fluorescência direta procurou identificar a morfologia celular presente em cada superfície avaliada, utilizando-se do corante fluorescente Alexa Fluor 488 e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) produzindo as colorações nas regiões de citoplasma (verde) e núcleo celular (azul), respectivamente. As células cultivadas em ambos os discos da liga Ti-cp ou Ti-15Mo com superfície laser + hidroxiapatita (LAP) no período de 3 dias, se demonstraram nos estágios iniciais de adesão celular, de formato pequeno, com difícil visualização devido a conformação da HA na superfície da liga ser tridimensional. Porém nas superfícies usinadas, as células se apresentaram com formato mais alongado, emitindo pequenos prolongamentos e com

aspecto achatado, representando um estágio mais avançado de desenvolvimento em comparação aos grupos tratados.

Nas superfícies usinadas, a partir do oitavo dia, as células já emitem os pequenos prolongamentos e estão em maior número, sem orientação preferencial. Em 15 dias, as células se apresentam em formato poligonal, unidas em orientação única, formando um confluente celular. Nas superfícies tratadas, somente é possível visualizar a proliferação celular, sem evidenciar seu estágio morfológico pelas irregularidades da estrutura de HA. (Figura 5)

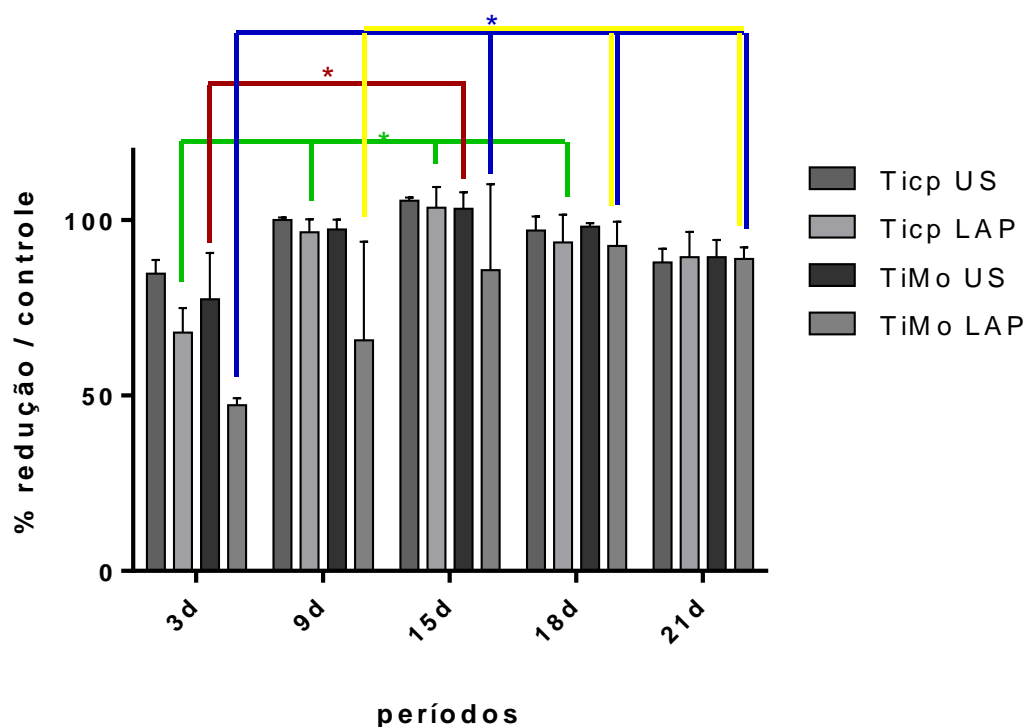
Figura 5 - Microscopia associada a fluorescência direta após 3, 8 e 15 dias de cultura celular.



Fonte: Elaboração própria

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste Alamar Blue no período de 3 a 21 dias de cultura celular, sendo um indicador de crescimento baseado na detecção da atividade metabólica celular. A resazurina é reduzida e transportada para fora das células onde se consegue quantificá-la pelo espectrofotômetro no sobrenadante, sendo que o número de células viáveis está relacionado com o nível de redução de corante, cuja viabilidade é expressa em percentual de redução. Houve diferença estatística na comparação intra-grupos na qual o período de 3 dias teve diferença com 9, 15 e 18 dias para liga Ticp-LAP; 3 e 15 dias para Ti15Mo – US; 3 dias com 15, 18 e 21 dias para liga Ti15Mo–LAP, assim como 9 dias para 18 e 21 dias ($p < 0,05$). Apesar das diferenças no percentual de redução nos períodos iniciais de todos os grupos, verifica-se proliferação celular com o passar dos dias, tendo seu auge de 15 a 18 dias. Aos 21 dias, todos os grupos se apresentam com percentual de redução semelhantes entre si (Figura 6).

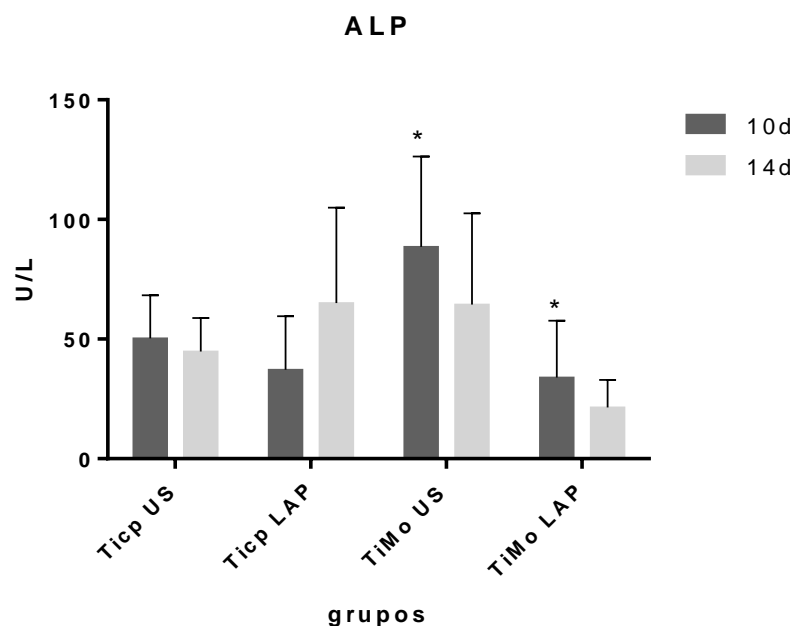
Figura 6 - AlamarBlue[®] - Diferença percentual de redução relacionada ao controle positivo (%) - comparação inter e intra-grupos (* diferença significativa entre os grupos: $p < 0,05$).



Fonte: Elaboração própria

A atividade de ALP, enzima que apresenta papel fundamental no processo de mineralização da matriz óssea é característica de osteoblastos ativos e apresentou maior atividade no período de 10 dias com relação aos 14 dias de cultura, com diferença estatística na liga Ti-15Mo entre US e LAP ($p < 0.05$) (Figura 7).

Figura 7 - Produção de Fosfatase Alcalina (U/L) no período de 10 e 14 dias, para os diferentes grupos e tratamentos (Média e DP). * = $p < 0.05$



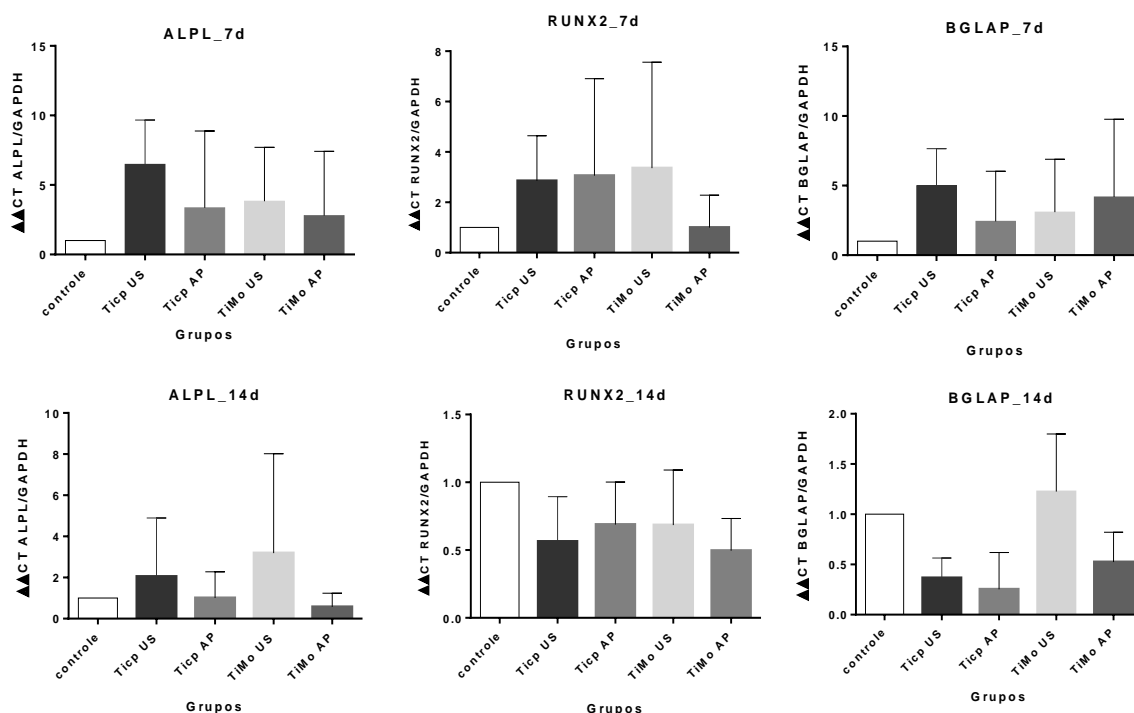
Fonte: Elaboração própria

Com o objetivo de avaliar o fenótipo osteoblástico das células obtidas da medula óssea de ratos e cultivadas em meio osteogênico, analisamos vários genes que codificam proteínas e fatores de transcrição, associados a diferentes etapas de maturação dos osteoblastos. O gene ALPL, o qual transcreve a enzima fosfatase alcalina, foi estimulado positivamente nas células cultivadas no disco Ti-cp-US em relação aos outros grupos, no período de 7 dias. Porém observa-se que aos 14 dias houve manutenção do estímulo para as células do disco Ti-15Mo-US, enquanto que nos outros grupos ocorre um decréscimo.

Os níveis de expressão gênica do fator de transcrição RUNX2 foram menores para as células cultivadas na liga Ti15Mo-LAP em comparação aos outros grupos aos 7 dias de cultura. Já aos 14 dias, os níveis de expressão foram menores que o controle,

sugerindo que os períodos iniciais de cultura sejam mais favoráveis para expressão desse fator de transcrição. A expressão relativa do mRNA do gene BGLAP, também conhecido como osteocalcina, foi aumentada no período de 7 dias de cultura celular, nas células semeadas nas superfícies Ticp-US e Ti15Mo-LAP. Porém aos 14 dias, esses níveis se mantiveram para o grupo Ti15Mo-US e diminuíram para os outros grupos em relação ao controle (Figura 8).

Figura 8 - Expressão gênica de fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina (BGLAP) e do fator de transcrição RUNX2, nos períodos de 7 e 14 dias de cultura celular, para os diferentes grupos.



Fonte: Elaboração própria

Discussão

O presente estudo avaliou uma nova liga de titânio - Ti-15Mo - e a influência do tratamento de superfícies modificadas com laser associadas a deposição de apatitas (HA) em suas características físico-químicas e nas respostas osteogênicas de células ósseas primárias de ratos cultivadas em amostras do disco. A liga Ti-cp foi utilizada como controle. Estudos demonstram que depósito de HA revestido por plasma spray nos implantes avaliados podem ser parcialmente dissolvidos após longos períodos de função¹⁸. Além disso, a técnica de pulverização por plasma não permite um controle

preciso da composição química e estrutura do revestimento¹⁸. Sendo assim, o método biomimético¹⁹ tem sido atualmente considerado um dos mais promissores na técnica para a produção de biomateriais e vários estudos demonstraram resultados favoráveis para o revestimento de titânio com HA^{15,19,20}, permitindo uma camada de revestimento HA estável fortemente ligada à superfície do implante de Ti.

De acordo com Sisti et al²¹ (2012) o processo de aplicação de laser associado a deposição de apatitas (LAP) produz defeitos homogêneos na superfície de Ti que são importantes em implantes por otimizarem sua osseointegração e além disso, a deposição biomimética controla a espessura da camada depositada, promove aumento da ligação ao substrato metálico e melhora a topografia superficial que aumenta a resposta do hospedeiro ao implante.

Com relação ao ângulo de contato, estudos anteriores²² obtiveram resultados de 70° em superfícies com recobrimento de magnésio, o mesmo resultado obtido em nossas amostras controle, reforçando que o tratamento com HA do presente estudo apresentou boa molhabilidade da superfície com resultados de 42° a 45°, assim como nos estudos de Zhang et al.²³ (2016) e Spriano et al.²⁴ (2005) em superfícies tratadas quimicamente.

Em um estudo sobre crescimento celular usando osteoblastos e biomateriais, Ramires et al²⁵ (2002) mostrou que houve agregação celular precoce, diferenciação e mineralização celular em superfícies de TiO₂ revestidas com hidroxiapatita. Outros estudos também demonstraram que o revestimento de apatita pode facilitar a diferenciação osteogênica e promover o crescimento do osso^{26,27}. Os resultados demonstraram que as células cultivadas em amostras controle (US) de Ti-cp e Ti-15Mo apresentaram um espalhamento similar para ambas as ligas, na qual as células se encontram com formato arredondado e aderidas na superfície no período de 3 dias e em maior número e mais prolongamentos, formando aglomerados aos 8 dias de cultivo. Nas superfícies tratadas com laser + hidroxiapatita (LAP), o tratamento parece favorecer o crescimento celular, comparado às células da superfície usinada (US). Ocorre maior área de contato celular criada pela estrutura da hidroxiapatita na qual os prolongamentos celulares se unem, formando uma estrutura celular tridimensional, semelhante aos osteoblastos, assim como nos estudos de Zhu et al.²⁸ (2017) na qual a incorporação de BMP-2 dentro do revestimento CaP facilitou o espalhamento de osteoblastos.

Nota-se que ambas as ligas e superfícies permitiram proliferação e manutenção das células viáveis, de forma similar, por todo o período do experimento (21 dias). As superfícies revestidas com HA, independente da liga, apresentaram tendência a menor quantidade celular aos 3 dias, porém, com rápida proliferação após este período, igualando-as aos demais grupos nos períodos mais tardios.

A influência do tratamento proposto na expressão gênica de células obtidas da medula óssea de ratos e cultivadas em diferentes superfícies em meio osteogênico foi demonstrada por análise de PCR em tempo real. Embora sem diferença estatística entre os grupos, as superfícies US tiveram maior influência na expressão do gene ALP, do fator de transcrição RUNX2 e do mRNA do gene BGLAP, aos 7 dias de cultura celular, fato que pode estar relacionado a uma maior quantidade de células nestes grupos nos períodos iniciais. O gene que codifica a enzima fosfatase alcalina é fundamental durante os estádios de mineralização exercidos por células osteoblásticas, como indicativo de calcificação e diferenciação assim como a expressão de RUNX2 aumenta durante a diferenciação celular, validando seu envolvimento na maturação do osteoblastos²⁹. Porém aos 14 dias, esses níveis diminuíram para todos os grupos estudados. Nos estudos de Oliveira et al.³⁰ (2011) em liga de Ti-15Mo tratadas com laser, as expressões de RUNX2, ALPL e SPP1 permaneceram inalteradas em comparação aos discos US.

Em geral, as células cultivadas em superfícies mais irregulares tendem a exibir maior diferenciação osteoblástica do que aquelas células cultivadas em superfícies mais regulares, menor número de células e geralmente aumento da atividade de fosfatase alcalina³¹. Pode ser visto que as atividades de ALPase no dia 10 foram superiores ao dia 14, com diferença estatística na liga Ti-15Mo entre US e LAP ($p < 0,05$) provavelmente devido a menor proliferação do grupo LAP, comparada com a da superfície de US, nos períodos iniciais, conforme observado no teste de viabilidade celular.

Reafirmando os objetivos em caracterizar as superfícies da liga Ti-15Mo modificadas por laser associadas ao revestimento por apatitas e comparar o mecanismo biológico da interação de células ósseas com diferentes superfícies, vê-se nesse trabalho que a liga Ti15-Mo não interfere na parte biológica. Porém, a proposta de sua utilização é reforçada nos estudos de Pulikkottil et al.³² (2016) que ao comparar diversas ligas e sua

influencia na resistência à corrosão demonstrou que a liga Ti-Mo apresentou uma melhor resistência à corrosão do que Ti-Ni.

Conclusão

O tratamento com laser e revestimento com HA (LAP) proporcionou modificações favoráveis na superfície e maior molhabilidade, comparadas ao Ti-cp. As células osteoblásticas se comportaram de forma semelhante em ambas as ligas e superfícies tratadas, sem diferenças significativas, sugerindo que a liga Ti-15Mo é uma alternativa para o uso na Implantodontia pelas vantagens de sua propriedade mecânica. Novos estudos in vivo são necessários para a avaliação da osseointegração e possíveis efeitos do revestimento com HA proposto no presente estudo.

Referências

1. 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.
2. Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão FJL, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology – from micron to nanotopography. *Biomaterials*. 2008; 29 (28): 3822–35.
3. Oliveira NTC, Aleixo G, Caram R, Guastaldi AC. Development of Ti–Mo alloys for biomedical applications: Microstructure and electrochemical characterization. *Mater Sci Eng A Struct Mater*. 2007; 452-453: 727-31.
4. Kumar S, Narayanan TS. Corrosion behaviour of Ti-15Mo alloy for dental implant applications. *J Dent*. 2008; 36(7): 500-7.
5. Marquardt B, Shetty R. Beta Titanium alloy processed for high strength orthopedic applications. *J ASTM Int*. 2005; 2(9): 1-12.
6. Khosroshahi ME, Mahmoodi M, Saeedinasab H. In vitro and in vivo studies of osteoblast cell response to a titanium-6 aluminium-4 vanadium surface modified by neodymium:yttrium-aluminium-garnet laser and silicon carbide paper. *Lasers Med Sci*, 2009; 24(6):925-39.
7. Gaggl A, Schultes G, Muller WD, Karcher H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces - a comparative study. *Biomaterials*. 2000; 21(10): 1067-73.

8. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20 Suppl 4:185-206.
9. Tian YS, Chen CZ, Li ST, Huo QH. Research progress on laser surface modification of titanium alloys. *Appl Surf Sci.* 2005; 242 (1-2): 177–84.
10. Ong JL, Chan DCN. Hydroxiapatite and their use as coatings in dental implants: a review. *Crit Rev Biomed Eng.* 2000; 28(5-6): 667-707.
11. Barrère F, van der Valk CM, Meijer G, Dalmeijer RA, de Groot K, Layrolle P. Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003; 67(1): 655-65.
12. Yang GL, He FM, Hu JA, Wang XX, Zhao SF. Biomechanical comparison of biomimetically and electrochemically deposited hydroxyapatite-coated porous titanium implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68(2): 420-7.
13. Chang YL, Stanford CM, Wefel JS, Keller JC. Osteoblastic cell attachment to hydroxyapatite-coated implant surfaces in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14(2): 239-47.
14. Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, Beck-Broichsitter B, Jung O, Precht C et al. Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 6285620.
15. Aparecida AH, Fook MV, Guastaldi AC. Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. *J Mater Sci Mater Med.* 2009; 20(6): 1215-22.
16. Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z, Zhao G, Rupp F, Geis-Gerstorfer J et al. Potential of chemically Modified Hydrophilic Surface Characteristics to Support Tissue Integration of Titanium Dental Implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 88(2): 544-57.
17. Rajaraman R, Rounds DE, Yen SP, Rembaum A. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp Cell Res.* 1974; 88(2): 327-39.
18. Suchanec W, Yoshimura M: Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res.* 1998; 13: 94.
19. Abe Y, Kokubo T, Yamamuro T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. *J Mater Sci Mater Med.* 1990; 1: 233–8.
20. Sisti KE, Garcia Junior IR, Guastaldi AC, Antonioli ACMB, de Rossi R, Brochado Neto AL. Analyse titanium surface irradiated with laser, with and without deposited of durapatite. *Acta Cir Bras.* 2006; 21(suppl 4): 57–62.
21. Sisti KE, de Rossi R, Antonioli ACMB, Ayudos RD, Guastaldi AC, Queiroz TP et al. Surface and biomechanical study of titanium implants modified by laser with and

- without hydroxyapatite coating, in rabbits. *J Oral Implantol.* 2012; 28 (suppl 3): 232-7.
22. Kwon YD, Lee DW, Hong SO. Magnesium vs. machine surfaced titanium - osteoblast and osteoclast differentiation. *J Adv Prosthodont.* 2014; 6:157-64.
 23. Zhang CX, Falentin-Daudre C, Migonney V. Titanium alloy surface coatings using poly(sodium styrene sulfonate) and poly(acrylic acid). *Biomed Mater Eng.* 2016; 27(6): 657-68.
 24. Spriano S, Bosetti M, Bronzoni M, Vernè E, Maina G, Bergo V et al. Surface properties and cell response of low metal ion release Ti-6Al-7Nb alloy after multi-step chemical and thermal treatments. *Biomaterials* 2005; 26(11): 1219-29.
 25. Ramires PA, Giuffrida A, Milella E. Threedimensional reconstruction of confocal laser microscopy images to study the behaviour of osteoblastic cell grown on biomaterials. *Biomaterials.* 2002; 23:397-406.
 26. Hagi TT, Enggist L, Michel D, Ferguson SJ, Liu YL, Hunziker EB. Mechanical insertion properties of calcium-phosphate implant coatings. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21: 1214-22.
 27. Yang F, Zhang R, He FM, Wang XX, Zhao SF, Yang GL. Osteoblast response to puerarin-loaded porous titanium surfaces: an in vitro study. *J Biomed Mater Res A* 2012; 100: 1419-26.
 28. Zhu X, Zhang H, Zhang X, Ning C, Wang Y. In vitro study on the osteogenesis enhancement effect of BMP-2 incorporated biomimetic apatite coating on titanium surfaces. *Dent Mater J.* 2017; 36(5): 677-85.
 29. Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A et al. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene.* 2004; 23(24): 4315-29.
 30. Oliveira NTC, Perrotti V, Palmieri A, Guastaldi AC, Pellati A, Scapin CL et al. In vitro analysis with human bone marrow stem cells on Ti-15Mo alloy for dental and orthopedic implants application. *J Osseoint.* 2011; 1(3): 10-6.
 31. Bächle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Impl Res.* 2004; 15: 683-92.
 32. Pulikkottil VJ, Chidambaram S, Bejoy PU, Femin PK, Parson P, Rishad M. Corrosion resistance of stainless steel, nickel-titanium, titanium molybdenum alloy, and ion-implanted titanium molybdenum alloy archwires in acidic fluoride-containing artificial saliva: an in vitro study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2016; 8(1): S96-9.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, um dos desafios da Implantodontia é acelerar o crescimento de tecido ósseo ao redor do implante. Assim, uma maneira de reduzir o tempo e aumentar a qualidade da osseointegração é modificando as propriedades da superfície dos implantes. Frente a este desafio, o desenvolvimento de superfícies que acelerem o processo de osseointegração dos biomateriais intraósseos é um paradigma atual em vários campos de pesquisa.

O estudo de materiais para criação de superfícies de implantes dentários tem se tornado um tema desafiador, impulsionado por desafios clínicos e em busca de um maior índice de sucesso. Nesse aspecto, o desenvolvimento de superfícies é um ponto crítico, de modo que as propriedades físicas e químicas da superfície de um implante influenciam o tipo e a intensidade de interação com proteínas e células osteogênicas, determinando a interface implante-osso.

Diversos métodos estão sendo desenvolvidos ou aprimorados para alcançar os objetivos esperados, considerando um menor tempo de osseointegração e aumentando a taxa de sucesso de reabilitações orais. As modificações de superfícies tanto com a utilização de laser, a deposição de apatitas ou tratamentos químicos apresentam uma vasta literatura na biologia óssea, com resultados promissores quanto a melhora das respostas celulares.

O presente trabalho propôs a caracterização superficial da liga Ti-15Mo por meio de avaliações físicas, químicas e biológicas, para investigação das respostas celulares frente às diferentes superfícies, que podem promover influência positiva ou negativa na osteogênese. Diante das observações até o momento, os tratamentos de superfície realizados atingiram os objetivos de modificar as características físico-químicas das ligas Ti-cp e Ti-15Mo, de forma que os eventos intermediários observados na RBMSC sugerem favorecer a osseointegração.

Estudos futuros sugerem observar as vantagens dessas modificações em modelos in vivo para estabelecer e provar a eficácia da osseointegração, bem como para criar novas perspectivas em Implantologia.

REFERÊNCIAS*

1. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003; 67(8): 932-49.
2. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Impl Res.* 2009; 20 Suppl 4: 172-84.
3. Jokstad A, Braegger U, Brunski JB, Carr AB, Naert I, Wennerberg A. Quality of dental implants. *Int Dent J.* 2003; 53(6 Suppl 2): 409-43.
4. Oliveira NTC, Aleixo G, Caram R, Guastaldi AC. Development of Ti–Mo alloys for biomedical applications: Microstructure and electrochemical characterization. *Mater Sci Eng A Struct Mater.* 2007; 452-453:727-31.
5. Bello SA, de Jesus-Maldonado I, Rosim-Fachini E, Sundaram PA, Difffoot-Carlo N. In vitro evaluation of human osteoblast adhesion to a thermally oxidized gamma-TiAl intermetallic alloy of composition Ti-48Al-2Cr-2Nb (at.%). *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21(5): 1739-50.
6. Oliveira NTC, Guastaldi AC. Electrochemical stability and corrosion resistance of Ti-Mo alloys for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2009; 5:399-405.
7. Fazano CATV. *A prática metalográfica.* São Paulo: Hemus; 1980.
8. Kumar S, Narayanan TS. Corrosion behaviour of Ti-15Mo alloy for dental implant applications. *J Dent.* 2008; 36(7): 500-7.
9. Martins Junior JRS, Matos AA, Oliveira RC, Buzalaf MAR, Costa I, Rocha LA, Grandini CR. Preparation and characterization of alloys of the Ti–15Mo–Nb system for biomedical applications. *J Biomed Mater Res Part B* 2018; 106B:639–48.
10. Oliveira NTC, Guastaldi FPS, Perrotti V, Hochuli-Vieira E, Guastaldi AC, Piattelli A, et al. Biomedical Ti–Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits. *Clin Impl Dent Relat Res.* 2013; 15(3): 427-37.
11. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981; 52(2):155-70.
12. Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005; 25(1):63-74.
13. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Impl Res.* 2009; 20 Suppl 4:185-206.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

14. Lusquinos F, De Carlos A, Pou J, Arias JL, Boutinguiza M, Leon B, et al. Calcium phosphate coatings obtained by Nd:YAG laser cladding: physicochemical and biologic properties. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 64(4): 630-7.
15. Zhu X, Eibl O, Scheideler L, Geis-Gerstorfer J. Characterization of nano hydroxyapatite/collagen surfaces and cellular behaviors. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 79(1): 114–27.
16. Suzuki K, Aoki K, Ohya K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone*. 1997; 21(6):507-14.
17. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr. et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res*. 1995; 29(3):389-401.
18. Gotz HE, Muller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben RG, Stangl R. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials*. 2004; 25(18):4057-64.
19. Tavangar A, Tan B, Venkatakrishnan K. Synthesis of bio-functionalized three-dimensional titania nanofibrous structures using femtosecond laser ablation. *Acta Biomater*. 2011; 7(6):2726-32.
20. Deppe H, Warmuth S, Heinrich A, Korner T. Laser-assisted three-dimensional surface modifications of titanium implants: preliminary data. *Lasers Med Sci*. 2005; 19(4): 229-33.
21. Singh R, Kurella A, Dahotre NB. Laser surface modification of Ti-6Al-4V: wear and corrosion characterization in simulated biofluid. *J Biomater Appl*. 2006; 21(1): 49-73.
22. Hallgren C, Reimers H, Chakarov D, Gold J, Wennerberg A. An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials*. 2003; 24(5): 701-10.
23. Khosroshahi ME, Mahmoodi M, Saedinasab H. In vitro and in vivo studies of osteoblast cell response to a titanium-6 aluminium-4 vanadium surface modified by neodymium: yttrium-aluminium-garnet laser and silicon carbide paper. *Lasers Med Sci*. 2009; 24(6): 925-39.
24. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67(8): 1706-15.
25. Hindy A, Farahmand F, Tabatabaei FS. In vitro biological outcome of laser application for modification or processing of titanium dental implants. *Lasers Med Sci*. 2017; 32(5): 1197-206.

26. Aparecida AH, Fook MV, Guastaldi AC. Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. *J Mater Sci Mater Med.* 2009; 20(6): 1215-22
27. Morris HF, Ochi S, Spray JR, Olson JW. Periodontal-type measurements associated with hydroxyapatite-coated and non-HA-coated implants: uncovering to 36 months. *Ann Periodontol.* 2000; 5(1): 56-67.
28. Lavenus S, Louarn G, Layrolle P. Nanotechnology and dental implants. *Int J Biomater.* 2010; 2010: 915327.
29. Chang YL, Stanford CM, Wefel JS, Keller JC. Osteoblastic cell attachment to hydroxyapatite-coated implant surfaces in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14(2): 239-47.
30. Torensma R, ter Brugge PJ, Jansen JA, Figdor CG. Ceramic hydroxyapatite coating on titanium implants drives selective bone marrow stromal cell adhesion. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14(5): 569-77.
31. Sela, J. Gross UM, Kohavi D, Shani J, Dean DD, Boyan BD et al. Primary mineralization at the surfaces of implants. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(4): 423-36.
32. de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials.* 2004; 25(3): 403–13.
33. Richert L, Vetrone F, Yi JH, Zalzal FF, Wuest JD, Rosei F et al. Surface nanopatterning to control cell growth. *Adv Mater.* 2008; 20(8): 1488–92.
34. Bagherzadeh R, Latifi M, Najar SS, Tehran MA, Kong L. Three-dimensional pore structure analysis of nano/microfibrous scaffolds using confocal laser scanning microscopy. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101(3): 765–74.
35. Mendonça G; Mendonça DBS, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography. *Biomaterials.* 2008; 29(28): 3822–35.
36. Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. *Nano today.* 2009; 4(1): 66–80.
37. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007; 23(7): 844-54.
38. Bagnò A, Di Bello C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15(9): 935–49.
39. Yi JH, Bernard C, Variola F, Zalzal FF, Wuest JD, Rosei F et al. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. *Surf Sci.* 2006; 600(19): 4613–21.

40. Kasemo B. Biological surface science. *Surf Sci.* 2002; 500 (1-3): 656–77.
41. Oliveira DP, Palmieri A, Carinci F, Bolfarini C. Osteoblasts behavior on chemically treated commercially pure titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2014; 102(6): 1816–22.
42. Tavares MG, de Oliveira PT, Nanci A, Hawthorne AC, Rosa AL, Xavier SP. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18(4): 452–8.
43. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Bioactive metals : preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15(2): 99–107.
44. Novaes AB Jr, de Souza SL, de Barros RR, Pereira KK, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J.* 2010; 21(6): 471–81.
45. Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z, Zhao G, Rupp F, Geis-Gerstorfer J et al. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 88(2): 544–57.
46. Spriano S, Bosetti M, Bronzoni M, Vernè E, Maina G, Bergo V et al. Surface properties and cell response of low metal ion release Ti–6Al–7Nb alloy after multi-step chemical and thermal treatments. *Biomaterials* 2005; 26(11): 1219–29.
47. Boyan BD et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 alfa, 25-(OH)2D3. *J Biomed Mater Res.* 1998; 39(1): 77-85.
48. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007; 23(7): 844-54.
49. Massaro C, Rotolo F, De Riccardis F, Milella E, Napoli A, Wieland M, et al. Comparative investigation of the surface of commercial titanium dental implants. Part 1: chemical composition. *J Mater Sci Mater Med.* 2002; 13:535–48.
50. Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials.* 2001; 22(11): 1241–51.
51. Anselme K, Bigerelle M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomater.* 2005; 1: 211–22.
52. Anselme K, Bigerelle M. Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short-term adhesion. *J Mater Sci Mater Med.* 2006; 17(5): 471–9.
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.

54. Le Guehennec L, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater.* 2008; 4(3): 535-43.
55. Ravichandran R, Liao S, Ng CCh, Chan CK, Raghunath M, Ramakrishna S. Effects of nanotopography on stem cell phenotypes. *World J Stem Cells.* 2009; 1(1): 55–66.
56. Ramires P, Cosentino F, Milella E, Torricelli P, Giavaresi G, Giardino R. In vitro response of primary rat osteoblasts to titania/hydroxyapatite coatings compared with transformed human osteoblast-like cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2002; 13(8): 797–801.
57. Oh S, Daraio C, Chen LH, Pisanic TR, Fiñones RR, Jin S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. *J Biomed Mater Res A.* 2006; 78(1): 97-103.
58. Hacking SA, Harvey E, Roughley P, Tanzer M, Bobyn J. The response of mineralizing culture systems to microtextured and polished titanium surfaces. *J Orthop Res.* 2008; 26(10): 1347-54.
59. Uggeri J, Guizzardi S, Scandroglio R, Gatti R. Adhesion of human osteoblasts to titanium: a morpho-functional analysis with confocal microscopy. *Micron.* 2010; 41(3): 210-9.
60. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel).* 2012; 12(9): 12347-60.
61. Ward BC, Webster TJ. The effect of nanotopography on calcium and phosphorus deposition on metallic materials in vitro. *Biomaterials.* 2006; 27(16): 3064-74.
62. Choi CR, Yu HS, Kim CH, Lee JH, Oh CH, Kim HW, et al. Bone cell responses of titanium blasted with bioactive glass particles. *J Biomater Appl.* 2010; 25(2): 99-117.
63. Tillotson N, Logan N, Brett P. Osteogenic stem cell selection for repair and regeneration. *Bone Rep.* 2016; 28(5): 22–32.
64. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13(1): 27-38.
65. Mendonca DBS, Miguez PA, Mendonca G, Yamauchi M, Aragao FJL, Cooper LF. Titanium surface topography affects collagen biosynthesis of adherent cells. *Bone.* 2011; 49(3): 463-72.
66. Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. Runx2: Of bone and stretch. *Int J Biochem Cell B.* 2008; 40: 1659–63.
67. Kim MJ, Kim CW, Lim YJ, Heo SJ. Microrough titanium surface affects biologic response in MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A.* 2006; 79(4): 1023-32.

68. Takashi M, Tsubaki S, Tsuzuki T, Duarte WR, Yamauchi M, Sato H. Differential gene expression of collagen-binding small leucine-rich proteoglycans and lysyl hydroxylases, during mineralization by MC3T3-E1 cells cultured on titanium implant material. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(3):225-31.

ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



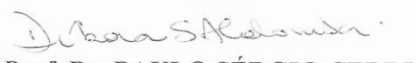
Proc. CEUA nº 34/2014

Araraquara, 19 de dezembro de 2014.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA desta Faculdade, em reunião hoje realizada, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado *"ESTUDO IN VITRO DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS ÓSSEAS EM SUPERFÍCIES DE TITÂNIO COM TOPOGRAFIA EM NANOESCALA, TRATADAS COM LASER ASSOCIADO OU NÃO À DISPOSIÇÃO DE APATITAS"* (Proc. CEUA nº 34/2014) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para **ABRIL/2018**.

Atenciosamente.



Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Ao
Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

**Não autorizo a reprodução deste trabalho até 23/03/2020.
(Direitos de publicação reservado ao autor)
Araraquara, 23 de Março de 2018.**

Fernanda Florian