



Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP



EDUARDO MARISCAL MUÑOZ

Diferenciação de osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio modificadas por irradiação com laser Yb:YAG pulsado de alta potencia.

Araraquara

2013



Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP



EDUARDO MARISCAL MUÑOZ

Diferenciação de osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio modificadas por irradiação com laser Yb:YAG pulsado de alta potencia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, como requisito para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

Araraquara

2013

Mariscal Muñoz, Eduardo

Diferenciação de osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio modificadas por irradiação com laser Yb:YAG pulsado de alta potência/ Eduardo Mariscal Muñoz.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

76 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

1. Lasers 2. Titânio 3. Nanotecnologia 4. Osteoblastos 5. Células cultivadas I. Título

EDUARDO MARISCAL MUÑOZ

Diferenciação de osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio modificadas por irradiação com laser Yb:YAG pulsado de alta potencia.

COMISSÃO JULGADORA

Dissertação para obtenção do grau de mestre

Presidente e Orientador:

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2º examinador:

Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza

Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Departamento de Materiais Dentários e Prótese.

3º examinador:

Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior

Univ Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese.

Araraquara

06 de Março de 2013

DADOS CURRICULARES

Nascimento

22 de Maio de 1986

Guadalajara, JAL, México.

Filiação

Eduardo Mariscal Ibarra

Ana Rosa Muñoz Gonzalez

2005-2010

Curso de graduação

Faculdade de Odontologia - Centro Universitario de Ciencias de la Salud

Universidad de Guadalajara

2011-2013

Curso de Mestrado – Área de Prótese

Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Universidade Estadual Paulista - UNESP

DEDICATÓRIA

Aos meus avós (*in memoriam*).

Pessoas honestas e trabalhadoras, seu exemplo de vida é um incentivo que me faz não desistir.

Aos meus pais.

Ana Rosa (*in memoriam*) e **Eduardo** por me apoiarem nos momentos precisos seja desde o céu ou aqui na terra. Sem seu suporte não teria sido possível, compartilho esta conquista com vocês.

A meus irmãos **Juan Francisco** e **Paloma** (*in memoriam*).

Nunca desista! Paixão e determinação não lhe deve faltar jamais.

Dedico este trabalho a vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus

A minha tia **Margarita**.

Pelos cuidados que me dedicou desde minha infância; pessoa carinhosa de bondade infinita, filha admirável e valiosa integrante da família. Deus colocou em você o dom de mãe.

A toda **a minha família**.

Por sempre acreditarem em mim, e por que sei que sempre contarei com vocês nos momentos de maior dificuldade. Isso verdadeiramente me reconforta.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A meu orientador **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**.

Pessoa que admiro muito. Por ter me recebido, pelo cuidado na sua orientação, por ter tido paciência, por ter me dado lições valiosas e sobretudo ter depositado sua confiança em mim. Não tenho palavras para expressar a gratidão pelos favores recebidos. Desejo que Deus lhe outorgue em dobro o que me foi outorgado. “vamos, adelante, seguimos...”.

A meu co-orientador o **Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza**.

Por ter pacientemente me ensinado; por confiar em mim nos momentos decisivos e pelo tempo e dedicação depositados na minha pessoa. Por ter sido meu amigo numa terra distante. Encontrar você no meu caminho foi uma das melhores surpresas que já tive na minha vida.

Vocês tem meu eterno agradecimento!

“Se procuras resultados diferentes, não faça sempre o mesmo ...”

Albert Einstein

Mariscal ME. Diferenciação de osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio modificadas por irradiação com laser Yb:YAG pulsado de alta potencia [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

RESUMO

A osseointegração, requisito indispensável para o sucesso dos implantes dentários, é um processo lento, caracterizado, sequencialmente, pelas etapas de adesão, diferenciação e proliferação celular, bem como pela aposição e mineralização da matriz óssea depositada por osteoblastos. Acelerar o processo de osseointegração significa reduzir o tempo de espera para a aplicação segura de uma carga funcional sobre os implantes de titânio (Ti). Sabe-se que vários fatores, tal como a topografia da superfície do Ti, influenciam diretamente o processo de osseointegração. Assim, desde que foi demonstrado que alguns padrões específicos de superfície do Ti são capazes de bio-estimular osteoblastos, favorecendo e acelerando a osseointegração, diversas técnicas de baixo custo, rápida execução e altamente reproduzíveis, tem sido propostas para tratar a superfície dos implantes. Desta maneira, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a capacidade de superfícies de Ti, modificadas com laser pulsado de alta potência (L) ou usinadas (U), de estimular a diferenciação e maturação de células obtidas de calvária de camundongos cultivadas sobre elas. Para isto, foram realizados ensaios laboratoriais para determinar a atividade mineralizadora das células (coloração com vermelho de alizarina e fosfatase alcalina), o metabolismo (MTT assay) e morfologia celular (MEV). A fim de melhor caracterizar a diferenciação de osteoblastos, foi realizada a reação de polimerização em cadeia (PCR) quantitativa em tempo real para analisar a expressão, pelas células cultivadas sobre as superfícies de Ti, de genes que codificam os fatores de transcrição *Runx2* e *Sp7* e proteínas específicas da matriz extracelular mineralizada (*Spp1*, *Alpl*, e *Col1a1*). Os dados numéricos obtidos foram submetidos a análise estatística. A superfície L foi capaz de aumentar a formação de nódulos de mineralização aos 14 dias em comparação com a superfície U (ensaio de vermelho de alizarina, $p < 0,05$). Esta atividade mineralizadora, estimada também pela presença da enzima fosfatase alcalina, foi observada desde o período de 7 dias e se manteve até o dia 14. O ensaio de MTT revelou que esta maior

capacidade mineralizadora não foi decorrente do aumento da proliferação celular, pois o metabolismo foi maior aos 14 dias em células cultivadas sobre a superfície U em comparação à superfície L (MTT assay, $p < 0,05$). Os genes que codificam para fatores de transcrição estimuladores de diferenciação de osteoblastos (*Runx2* e *Sp7*), assim como os genes que codificam para as proteínas osteopontina (*Spp1*), fosfatase alcalina (*Alp*) e cadeia $\alpha 1$ do colágeno tipo 1 (*Col1a1*) foram aumentados no período entre 24 horas até os 14 dias em células cultivadas em contato com a superfície L. De acordo com a metodologia empregada neste estudo, foi possível concluir que a criação de topografias híbridas (micro, submicro e nano) com laser de alta potência bioestimula a diferenciação terminal de osteoblastos a partir de células obtidas de calvária de camundongos e acelera o processo biológico de síntese e mineralização de matriz óssea.

Palavras chave: Lasers, Titânio, Nanotecnologia, Osteoblastos, Células Cultivadas.

Mariscal ME. Differentiation of osteoblasts cultured on titanium surfaces modified by Yb:YAG high energy pulsed laser [master degree dissertation]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

ABSTRACT

The osseointegration, which plays a fundamental role in the dental implantation success, is characterized by cell adhesion, differentiation, proliferation as well as deposition and mineralization of bone matrix by osteoblasts. To make the osseointegration process faster means reducing the period to apply a safe functional stress on the titanium (Ti) implants. A number of factors, such as the topographical surface of Ti enhances the osseointegration process. Different Ti surface treatments capable of bio-stimulating osteoblasts to accelerate the osseointegration have been evaluated. Current studies have shown that osseointegration of Ti devices is enhanced by surface roughness. In this way, the aim of the present investigation was to assess the capacity of Ti surfaces irradiated with high potency laser (L) or polished (U) to stimulate the differentiation and maturation of cells obtained from calvarian bone of mouse. Then, laboratorial protocols to evaluate the mineralizing cell activity (alizarin red assay), cell metabolism (MTT assay) as well as the morphology (SEM) of cells cultured on the Ti surfaces were carried out. To better characterize the osteoblast differentiation, the real time qPCR for expression of genes that code to the transcription factors *Runx2* and *Sp7* were performed. Additionally, this protocol was also used to assess specific proteins of extracellular matrix (*Spp1*, *Alpl*, e *Col1a1*). The numeric data were subjected to statistical analysis. Our data demonstrated that the Ti surface L improved the osteoblast maturation capacity of calvarial osteoblasts grown over this surface. Scanning electron microscopy (SEM) revealed spheres and protrusions created by laser treatment. Laser profilometry showed a disordered surface with micrometric and/to nanometric scales features ($R_a = 10.57\mu\text{m}$). When compared to polished Ti (U), laser modified titanium (L) increased the nodule formation as well as the alkaline phosphatase (ALPase) activity at 7 and 14 days. These effects were not due to increased cell proliferation since no difference in metabolic activity on cells cultured

over U and L surfaces after 1 and 3 days, and decreased activity after 7 days on L compared to U, as demonstrated by MTT assay. Relative quantification of gene expression (qPCR) revealed that transcription factors triggering osteoblast differentiation (*Runx2* and *Sp7*) were up-regulated at 1, 3, 7 and 14 days on L surface. Genes encoding to the extracellular bone matrix proteins collagen type-1 (*Col1a1*) and osteopontin (*Spp1*) were also increased at 1, 3, 7 and 14 days. Alkaline phosphatase (*Alpl*) transcript was increased in osteoblasts after 3 and 14 days of culture on L surface as compared to M surface. Treatment of titanium with high power laser created a rough surface that stimulates osteoblast differentiation and maturation, which turn faster the biological process of synthesis and mineralization of bone matrix.

Keywords: Lasers, Titanium, Nanotechnology, Osteoblasts, Cells Cultured

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

Al_2O_3	Óxido de alumínio
<i>Alpl</i>	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
<i>ATF4</i>	activating transcription factor 4
<i>Bglap</i>	Bone gamma carboxyglutamate protein
<i>C/EBPβ</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
<i>C/EBPδ</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta
C57/BI6	Camundongo C57 black 6
CaP	Fosfato de cálcio
<i>Cbfβ</i>	Core binding factor beta
Col-I	Colágeno tipo I
DNA	Deoxyribonucleic acid
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
Ha	Hidroxiapatita
HCl/ H_2SO_4	Ácido clorídrico/ Ácido sulfúrico
HF	Ácido fluorídrico
<i>lbsp</i>	<i>Integrin binding sialoprotein</i>
<i>lhh</i>	<i>Indian hedgehog</i>
IU	<i>Interational Units</i>
kHz	quilohertz
MEC	Matriz extra celular
<i>Menin</i>	<i>multiple endocrine neoplasia I</i>
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
mJ	Milijoule

mm	Milímetros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Bromídeo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
N	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nd:YAG	<i>Neodymium-doped yttrium aluminum garnet</i>
<i>NFATc1</i>	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
nm	Nanômetros
Nonidet P-40	Detergente não iônico
osx	Osterix
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
R _a	média aritmética da rugosidade
RANKL	<i>receptor activator of NF-kappa-B ligand</i>
RGD	Arginina, glicina e aspargina
rhBMP-2	BMP 2 recombinante humana
<i>Runx1/Cbfa2/PeBP2aB</i>	runt-related transcription factor 1
<i>Runx2</i>	runt-related transcription factor 2
<i>Runx2/Cbfa1/PeBP2aA</i>	runt-related transcription factor 2
<i>Runx3/Cbfa3/PeBP2aC</i>	runt-related transcription factor 3
SLA	<i>Sandblasted, large grit and Acid etching</i>
SMAD1	<i>SMAD family member 1</i>
SMAD5	<i>SMAD family member 5</i>
SMAD8	<i>SMAD family member 8</i>

SOX9	<i>SRY-box containing gene 9</i>
Sp7	<i>Sp7 transcription factor 7, osterix</i>
Spp1	<i><u>S</u>ecreted phosphoprotein 1</i>
Ticp	titânio comercialmente puro
Ti ₆ Al ₄ V	Liga de titânio alumínio e vanádio
TiO ₂	Óxido de Titânio
TPS	<i>Titanium plasma spray</i>
Tris	(hidroximetil) aminometano, com fórmula: (HOCH ₂) ₃ CNH ₂
VEGF	Fator de crescimento vascular
Yb:YAG	<i>Ytterbium: Yttrium aluminium garnet</i>
α-MEM	<i>Alfa Minimum Essential Medium</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	Diferenciação de Osteoblastos e Osseointegração	20
2.2	Métodos de Modificação da Superfície dos Implantes Dentários	27
2.2.1	Processos Subtrativos de Modificação do Ti.....	28
2.2.2	Processos Aditivos para Modificação do Ti	31
2.3	Modificação da Superfície de Titânio com Laser Pulsado de Alta Potência.....	35
3	PROPOSIÇÃO	38
4	MATERIAL E METODO.....	39
4.1	Irradiação do Ti	39
4.2	Caracterização da Superfície.....	39
4.3	Isolamento de Células de Calvária de Camundongo	40
4.4	Avaliação Morfológica das Células em Cultura	41
4.5	Quantificação de Nódulos de Mineralização	41
4.6	Medição da Atividade da Fosfatase Alcalina	42
4.7	Ensaio para Determinar o Metabolismo Celular	43
4.8	Isolamento do RNA e Análise da Expressão Gênica	43
4.9	Estatísticas	44
5	RESULTADO	45
5.1	Irradiação com laser cria superfícies com micro-nano topografias híbridas	45
5.2	Indução da Formação de Nódulos de Mineralização pela Superfície L	48
5.3	Maior Metabolismo Celular sobre o Titânio não Modificado.....	49
5.4	Atividade da ALPase é estimulada pelo Ti modificado com Laser.....	50
5.5	Genes associados à diferenciação e maturação de Osteoblastos foram estimulados pela Superfície L	51
5.6	Ti modificado com laser estimula a formação e mineralização de matriz extracelular	54

6 DISCUSSÃO	59
REFERENCIAS	65
APÊNDICE	74
ANEXO	75

1 INTRODUÇÃO

A incidência na perda de dentes permanentes cresce junto com a idade das pessoas, e numa sociedade que envelhece rapidamente como a nossa, a substituição destes dentes com próteses suportadas por implantes osseointegrados é uma prática comum e amplamente aceita. O material de escolha para a confecção de implantes é o titânio comercialmente puro, particularmente devido a sua biocompatibilidade e alta resistência à corrosão⁶⁴.

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 uma das três principais propriedades da superfície dos implantes (mecânicas, topográficas ou físico-químicas). Acelerar o tempo de osseointegração significa, também, aumentar os índices de sucesso, especialmente em casos de pobre qualidade óssea. Em 2006, Butz et al.¹⁶ demonstraram que implantes com rugosidade superficial aumentada induzem a formação de osso com maior dureza e rigidez quando comparados a implantes com superfícies sem tratamento (baixa rugosidade). Além disso, uma melhor qualidade na osseointegração induzida pela modificação da superfície do titânio (Ti) pode evitar a reabsorção óssea quando os implantes são colocados em função¹⁰⁵.

O correto processo de osseointegração depende da formação de osso novo ao redor do implante. Várias são as proteínas que controlam o processo de formação óssea por meio de interações da célula com a matriz extracelular e com outras células. Essas interações, as quais são mediadas por fatores de transcrição (*Runx2*, *osterix* e *beta-catenina*), desempenham um importante papel na osteogênese e induzem um fenótipo osteoblástico⁶¹. Quando a superfície dos implantes de Ti é modificada, criando topografias híbridas (micro- e nano-topografia), uma maior diferenciação celular passa a ser induzida, ocorrendo ainda o aumento na expressão de fatores de transcrição, síntese e secreção de proteínas ósseas⁵⁸.

A qualidade da interface implante/osso está diretamente relacionada com a interação entre as células formadoras de osso e o material de implantação⁹⁴. Com o objetivo de estimular positivamente essas células, tem sido propostas diferentes técnicas de modificação das superfícies de Ti. Independentemente do tipo de modificação empregada, a superfície do implante sempre deve permanecer livre de contaminantes¹². A nanotopografia da superfície do implante, uma característica altamente desejável, deve estimular a formação de osso de qualidade homogênea⁹⁵, sendo que em 2006, Balasundaram, Webster⁹ relataram que a superfície do titânio deve mimetizar as formas dos tecidos biológicos nos quais será inserido.

As maiores limitações das técnicas usadas na atualidade para modificar a superfície dos implantes osseointegráveis incluem: 1) a dificuldade no controle da uniformidade e distribuição das estruturas sobre a superfície; 2) a possibilidade de que materiais usados nos processos de modificação possam permanecer nas superfícies para atuar como contaminantes inorgânicos e interferir na osseointegração, ou então serem liberados no local¹²; desde que já foi demonstrado que implantes livres de contaminantes permitem maior crescimento de osso adjacente 3) os altos custos dos processos de tratamento superficial e a necessidade de manuseios adicionais.

Um processo simples, capaz de modificar a superfície do titânio, que mantém o material livre de contaminantes, é a irradiação com laser pulsado de alta potência. Tem sido demonstrado que este processo é altamente reproduzível e permite a obtenção de uma superfície dura, rugosa, e com alta resistência à corrosão. Além disso, o conteúdo de TiO_2 , principal responsável pela excelente biocompatibilidade do material é aumentado, beneficiando na osseointegração do implante⁴³.

A aceleração do correto processo de osseointegração, que permite habilitar o implante para receber uma carga funcional de maneira segura, é um desafio constante no mercado de implantes dentais. Um reduzido tempo de osseointegração é especialmente importante em casos onde se precisa reestabelecer rapidamente a função, estética e/ou fonética perdidas, ou em casos com o paciente apresenta baixa qualidade óssea. Sendo assim, neste trabalho de pesquisa foi avaliada a influência da modificação do titânio comercialmente puro com laser de alta potência sobre o metabolismo de osteoblastos obtidos de calvária

de camundongos. Esta proposta de trabalho se baseou no fato de que, até os dias de hoje, a relação entre superfície de titânio, mecanismos de diferenciação celular e estimulação da síntese, deposição e mineralização de matriz óssea por osteoblastos, não foi completamente explorada pelos pesquisadores. Além disso, acelerar o processo biológico de osseointegração, através do emprego de uma técnica de tratamento de superfície do titânio de baixo custo, que permita baixos custos de aplicação por implante, pode favorecer uma população de baixo poder aquisitivo, a qual passará ter maior acesso aos procedimentos clínicos de reposição de elementos dentários perdidos, através do uso de implantes. Desta forma, consideramos que os dados científicos obtidos com o desenvolvimento deste estudo são relevantes para a área do conhecimento no qual é inserido, e sendo assim, direciona futuras investigações in vitro e in vivo dentro desta linha de pesquisa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O Ti e suas diferentes ligas são comumente usados para usinagem de implantes para diversas aplicações biomédicas, pois fornecem uma interface biocompatível com os tecidos, excelentes propriedades mecânicas e também pela estabilidade química e resistência à corrosão¹²⁹. Sabe-se que uma estável camada de óxido⁸⁹, a qual é formada espontaneamente quando o Ti é exposto ao oxigênio, é a principal responsável pela biocompatibilidade do metal/implante e sua adequada osseointegração⁶.

2.1 Diferenciação de Osteoblastos e Osseointegração

Os osteoblastos, bem como os condrócitos, adipócitos, mioblastos, e fibroblastos, são derivados de células tronco mesenquimais. Dentro do grupo de células de linhagem osteoblástica estão os progenitores mesenquimais, pré-osteoblastos, osteoblastos (algumas vezes denominados osteoblastos maduros), células ósseas superficiais e osteócitos. A formação de tecido ósseo é um processo complexo, o qual envolve o recrutamento e diferenciação de osteoblastos e a síntese, deposição e posterior mineralização de uma matriz extracelular. Existem dois tipos diferentes de ossificação, a intramembranosa que esta limitada a certas partes do crânio⁸², e a endocondral. Durante o primeiro tipo de ossificação, as células mesenquimais diferenciam-se em osteoblastos, como é o caso da formação óssea ao redor do implante dental.

Os mecanismos que levam a formação de osso ao redor dos implantes podem ser fenomenologicamente divididos em três distintas fases, as quais podem ser dirigidas experimentalmente: 1) a primeira é de osseocondução, onde células mesenquimais indiferenciadas migram até a superfície do implante e assumem a função osteoblástica; 2) a segunda se refere à formação de osso novo que resulta numa matriz mineralizada; 3) e a terceira é a resposta tecidual local, a qual corresponde à remodelação óssea²⁴.

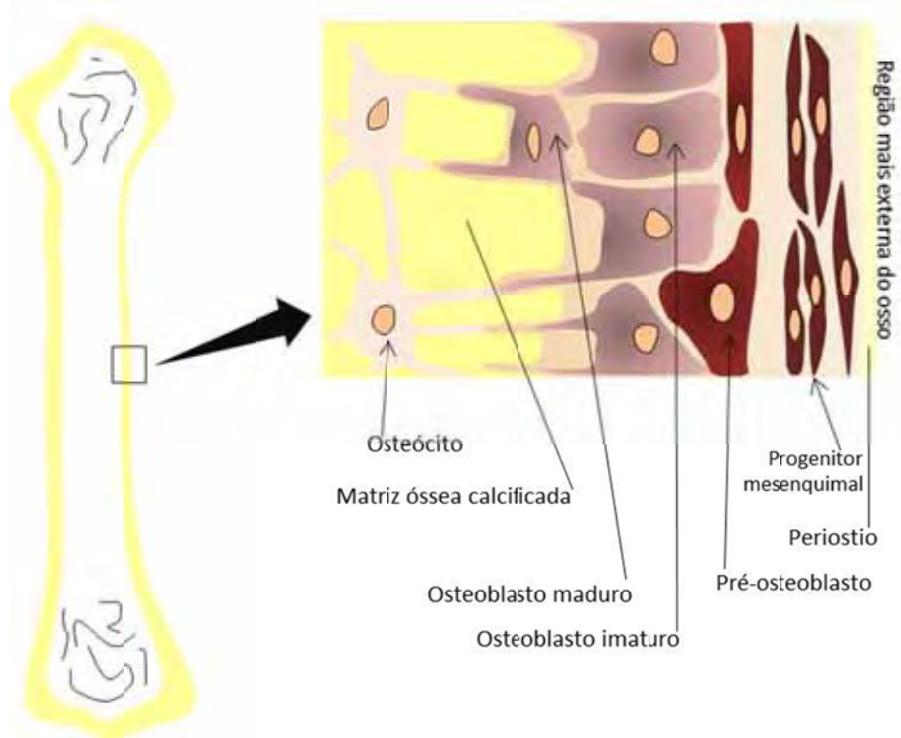
Para serem caracterizados como osteoblastos formadores de osso, as células mesenquimais precisam se diferenciar, inicialmente, em pré-osteoblastos e

posteriormente em osteoblastos maduros. Estas células formadoras de osso são caracterizadas por produzir uma combinação peculiar de proteínas, incluindo osteocalcina, fosfatase alcalina e uma grande quantidade de colágeno tipo I. A matriz óssea, rica em colágeno tipo I, é também conhecida como osteóide e inicialmente é depositada por osteoblastos ativos e subseqüentemente é mineralizada através da deposição de fosfato de cálcio na forma de hidroxapatita; este processo dá origem a um material composto (orgânico e inorgânico), o qual representa o maior constituinte do osso⁴⁵.

Nas condições in vivo, as células de linhagem osteoblástica, com exceção do osteócito, são geralmente encontradas na região do perióstio do osso cortical. Avaliações detalhadas desta estrutura, mostram a presença de progenitores mesenquimais com formato de fibroblastos alongados nas camadas mais superficiais, sendo que osteoblastos maduros de morfologia cubóide se encontram em contato direto com a superfície do osso; os pré-osteoblastos residem na região intermediária, ou seja, entre estas duas populações^{83, 88} (Figura 1).

Para melhor compreensão da biologia do osteoblasto, o processo de diferenciação tem sido comumente dividido em estágios de progenitores mesenquimais, pré-osteoblastos e osteoblastos. Geralmente, todas as células que estão se transformando de progenitores a osteoblastos maduros, são conhecidos como pré-osteoblastos. Estas células, diferentemente dos osteoblastos maduros, apresentam capacidade de se dividir ativamente in vitro⁸⁴. Os pre-osteoblastos são caracterizados por expressar genes que são fatores de transcrição estimuladores de diferenciação, tal como *Runx2* (runt-related transcription factor 2), sendo que num estágio mais avançado, também passam a expressar *osterix*.

Figura 1 - Esquema mostrando a localização das células de linhagem osteoblástica.



Existem vários sinais reguladores que estimulam a diferenciação de osteoblastos, tal como a presença da esclerostina¹¹⁴. Esta proteína é codificada pelo gene *SOST* e produzida predominantemente pelo osteócito estimulado de maneira mecânica⁹², como ocorreria naturalmente na colocação de implantes dentais.

A diferenciação dos osteoblastos, a partir de seus progenitores mesenquimais, requer, também, a atividade de fatores de transcrição específicos, a qual depende do estágio de diferenciação (Figura 2). Dentre estes fatores, destacam-se *Runx2*, *osterix*, *β -catenina* e *SOX9*, visto que a falta de algum deles resulta na ausência ou carência de osteoblastos⁶¹.

Figura 2 - Esquema mostrando a relação dos fatores de transcrição. A diferenciação de osteoblastos é inicialmente marcada pela expressão de *Sox9*, seguido por *Runx2* e finalmente por *Osx*. O osteoblasto maduro é marcado pela presença extracelular de colágeno tipo I (*Col1a1*) fosfatase alcalina (*Alpl*) e invariavelmente por osteopontina (*Spp1*).



O gene *SOX9*, o qual é fundamental para o desenvolvimento do esqueleto, é um comum marcador das células progenitoras de osteoblasto. Porém, este gene não é expresso por osteoblastos maduros¹, embora seu papel na diferenciação não seja conhecido totalmente. A inativação do gene *SOX9* na etapa mesenquimal de gérmen, resulta na falta de formação de osteoblastos pela ausência conjunta do gene *Runx2*¹.

O *Runx2* pertence a uma família composta por três genes: 1) *Runx1/Cbfa2/Pebp2aB*; 2) *Runx2/Cbfa1/Pebp2aA*; e 3) *Runx3/Cbfa3/Pebp2aC*. Estas proteínas *Runx1/2/3* formam heterodímeros, como o co-ativador de transcrição do core binding factor β (*Cbfb*). Enquanto *Runx1* é essencial para a diferenciação de células tronco hematopoiéticas, *Runx2* é imprescindível na diferenciação de osteoblastos e *Runx3* tem um papel importante na regulação do crescimento de células epiteliais gástricas e na neurogênese. A expressão do *Runx2* ocorre antes² e de maneira dependente¹ da correta expressão do *SOX9* durante o desenvolvimento dos membros no embrião de camundongo. A transcrição de *Runx2* é estimulada pelas proteínas *C/EBP β* , *C/EBP δ* , *Menin*, *Smad1*, e *Smad5*⁶². A supressão do gene em questão leva à completa ausência de osteoblastos em camundongos⁶³. Além de ser imprescindível na diferenciação, *Runx2* é necessário para o correto metabolismo dos osteoblastos maduros, incluindo nos processos de síntese e mineralização de matriz óssea²⁹.

Osterix (Osx/Sp7), fator de transcrição necessário na diferenciação de osteoblastos, pertence à família SP de fatores de transcrição. Eles estão envolvidos

em vários processos celulares e na resposta ao microambiente celular¹¹⁸. Vários fatores de transcrição regulam a expressão de *Sp7*, dentre eles o supressor de tumor *p53*, o qual diminui os níveis do gene por mecanismos ainda desconhecidos¹¹⁹, o *nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1 (NFATc1)*; fator de transcrição sensível ao cálcio, conhecido por estimular a diferenciação de osteoblastos aumentando a atividade transcricional do *Sp7*¹²⁵. Camundongos nocaute para *Sp7* mostraram completa ausência de osteoblastos, determinando, assim, que *osterix* é um fator de transcrição essencial para diferenciação de osteoblastos⁸⁰. Em 2002, Nakashima et al.⁸⁰ demonstraram que em camundongos nulos para *Runx2*, a expressão de *Sp7* era também suprimida. Este gene tem a capacidade de aumentar a diferenciação de células mesenquimais em células de linhagem osteoblástica¹⁰⁶, sendo ainda, essencial para a função dos osteoblastos maduros após o nascimento, tal como comprovado recentemente por Zhou et al.¹²⁸ (2010).

A *β-catenina* outro fator de transcrição intracelular essencial, é requerido na diferenciação de osteoblastos, particularmente no momento em que a célula se encontra na fase de pré-osteoblasto. Quando ligado ao *transcription factor 1 (TcF1)* este gene estimula a expressão de *Runx2*, induzindo as células progenitoras a se diferenciarem em osteoblastos. No ano de 2005, Hill et al.⁴⁸ provaram que a inativação da *β-catenina* em células mesenquimais elimina a capacidade dessas células de se diferenciar em osteoblastos. Foi relatado ainda, que junto com *Sp7*, a *β-catenina* estimula o pré-osteoblasto a se transformar num osteoblasto imaturo⁶¹. A *β-catenina* também apresenta papel fundamental na diferenciação de osteoblasto no embrião, sendo necessária para a progressão desde a fase onde as células são maioritariamente positivas a *Runx2* até chegar a precursores tardios positivos tanto para *Runx2* quanto para *osterix*⁹³.

O fator de transcrição *Activating transcription factor 4 (ATF4)*, considerado importante nas células maduras da linhagem osteoblástica, parece agir de 2 maneiras no processo de diferenciação de osteoblastos: 1) regulando diretamente a expressão da osteocalcina (proteína derivada de osteoblastos); e 2) modulando a expressão do ligante do fator nuclear-κB (*RANKL*)³², conhecido promotor da função e diferenciação de osteoclastos.

Os fatores de transcrição tratados anteriormente são regulados por uma série de sinais de desenvolvimento. Um desses sinais é a sinalização pelas proteínas *Ihh* (Hedgehog ou Indian hedgehog), expressas especificamente pelos condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos de maneira precoce, os quais podem atingir condrócitos e células pericondriais adjacentes para promover diferenciação de osteoblastos¹⁰³. Embora não seja totalmente compreendido como acontece, sabe-se que na ausência da sinalização *Ihh*, os progenitores pericondriais não são capazes de expressar *Runx2*, fator de transcrição indispensável para a diferenciação de osteoblastos.

Outro tipo de sinal é o conjunto de sinalizações Notch, o qual facilita ou regula a comunicação entre células vizinhas através de contatos célula a célula. Estudos genéticos em camundongos sugeriram que a supressão da sinalização Notch suprime a diferenciação de osteoblastos⁴⁷.

A via de sinalização WNT (família de proteínas) tem importante papel na regulação da diferenciação de células de linhagem osteoblástica. Esta sinalização específica tem sido implicada por promover progressão das células positivas para *Runx2* e *Sp7* através de um mecanismo ainda desconhecido¹¹¹.

A sinalização pelas BMPs (siglas em inglês para proteínas morfogênicas de osso), tem papel essencial numa ampla variedade de processos biológicos. O mecanismo mais estudado é o de acoplamento com receptores de membrana (type I and type II Ser /Thr kinase), que por sua vez, ativam, por fosforilação, algumas proteínas intracelulares (SMADs) que traduzem sinais extracelulares desde a membrana celular, tais como a SMAD1, SMAD5 e SMAD8. As SMADs fosforiladas formam um complexo com a proteína SMAD4 e entram no núcleo celular, ativando a expressão gênica. Em 2006, Bandyopadhyay et al.¹⁰ demonstraram que a sinalização promovida por BMP2 e BMP4 é requerida para a diferenciação de osteoblastos maduros através do controle da transição em células positivas para *Runx2* até células positivas para *Runx2* e *Sp7*. Ainda dentro deste contexto, foi demonstrado que estes sinais também regulam a função de osteoblastos maduros.

Uma vez que foi conferido à célula mesenquimal o fenótipo de osteoblasto, toma lugar o processo de sínteses de matriz mineralizada. O processo de mineralização in vivo ocorre em dois passos sucessivos, sendo iniciado por uma

mineralização primária, a qual acontece de 14 a 22 dias, saturando em torno de 50-60% da matriz extracelular (MEC); esta, por sua vez, passa por um processo de mineralização secundária, a qual acontece com o decorrer dos anos.

O tecido ósseo é essencialmente uma matriz vascularizada, composta por proteínas orgânicas e minerais inorgânicos de fosfato de cálcio. As proteínas orgânicas consistem principalmente em colágeno tri-fibrilar do tipo 1 (Col-I) (<90%) e proteínas relacionadas com a mineralização óssea contidas em vesículas matriciais. O Col-I forma um arcabouço, no qual as vesículas de matriz se aderem, originando sítios de nucleação de cálcio. Neste sítios, ocorre a síntese de fosfato de cálcio para formar o mineral de hidroxiapatita, reação facilitada pela ação da enzima fosfatase alcalina³⁸.

O gene *Runx2*, claramente identificado como fator de transcrição essencial na diferenciação de célula osteogênica, induz a expressão sequencial de genes regulados por ele mesmo, os quais codificam proteínas osteogênicas essenciais para maturação e formação de cristais de hidroxiapatita¹⁰², bem como para a manutenção da integridade funcional e estrutural do tecido ósseo¹⁰⁴. Entre essas proteínas estão a sialoproteína óssea (*Ibsp*, *integrin-binding sialoprotein*), osteocalcina ou *Bglap* (*bone gamma-carboxyglutamate protein*), osteopontina (*Spp1*, *secreted phosphoprotein 1*) e a enzima fosfatase alcalina (*Alpl*). A *Ibsp* é uma fosfoproteína de osso altamente ácida, a qual tem papel importante na mineralização da matriz extracelular - MEC^{8, 53}, contribuindo cooperativamente com o Col-I⁸. A osteocalcina, proteína de origem não colagenosa, é mais abundante da matriz óssea, sendo sintetizada apenas por osteoblastos maduros; esta proteína é considerada um importante marcador da diferenciação de osteoblastos²⁸. Sabe-se que a *Spp1* interage com as moléculas que constituem a matriz óssea, sendo que sua alta afinidade pelo cálcio sugere seu importante papel na modulação e nucleação de fosfato de cálcio durante a mineralização da matriz óssea¹⁰². As proteínas *Ibsp*, *Bglap* e *Spp1*, as quais estão presentes nos tecidos mineralizados, têm sua quantidade aumentada com o decorrer do tempo, apresentando-se mais abundantes em áreas de maior densidade óssea¹⁰².

Uma sequência de processos, envolvidos e caracterizados pela diferenciação celular bem como maturação e mineralização da matriz, precisam acontecer para

que a osseointegração dos implantes de Ti seja bem sucedida. Foi bem demonstrado que a superfície dos implantes é a responsável direta pela qualidade da interação entre a célula que irá formar osso e o dispositivo implantável colocado. Visando acelerar e/ou melhorar os processos de diferenciação e mineralização da matriz extracelular, vários métodos para modificar a superfície dos implantes dentais têm sido usados, cuja proposta principal é aumentar e viabilizar a rugosidade da estrutura. Tem sido revisada a relação entre a resposta óssea após a fixação do implante e a rugosidade da superfície. Foi relatado que ambas são melhoradas quando se eleva a rugosidade, pois ao mesmo tempo se aumenta a superfície de contato osso-implante⁹⁸. Assim, a resposta tecidual após a implantação determina o sucesso no processo de reparo tecidual, sendo que esta resposta não é dependente apenas da topografia ou da rugosidade superficial, mas também das propriedades físico-químicas da superfície do implante⁹⁰.

2.2 Métodos de Modificação da Superfície dos Implantes Dentários

É importante mencionar que o implante possui três principais propriedades (mecânicas, topográficas e físico-químicas), sendo que alterar alguma delas significa afetar as duas restantes, o que pode conseqüentemente influenciar no processo de osseointegração. Há mais de 3 décadas, Albrektsson et al.³ (1981) identificaram a estrutura da superfície do implante como um dos seis fatores particularmente importantes para que ocorra uma correta incorporação do implante ao osso. Assim, o aumento na rugosidade da superfície dos implantes de titânio, pode influenciar, de maneira positiva, o processo de osseointegração no sentido de se obter melhores resultados clínicos.

Há aproximadamente 20 anos, os pesquisadores começaram a avaliar e apresentar para a comunidade científica a importância da rugosidade de superfície e estabelecer seus parâmetros específicos. Desta maneira, os parâmetros (perfis) descritivos de altura R_a , R_q , R_z e R_t , são as medidas mais comumente usadas e descrevem valores bidimensionais. Mais recentemente, foram estabelecidas as medidas tridimensionais S_a , S_q , S_z , e S_t . Sabe-se que o S_a (contraparte tridimensional do R_a) corresponde à média aritmética do perfil projetado pela superfície (R_a). O R_q , que em termos tridimensionais corresponde ao S_q , é a média

do quadrado da raiz do perfil (R_q), porém da superfície completa. R_z (S_z em termos tridimensionais), é a média dos cinco vales mais baixos e dos 5 picos mais altos em sentido do perfil (R_z) ou na superfície inteira (S_z). O valor R_t corresponde à medida desde o maior pico até o vale mais fundo no sentido de perfil, sendo que o S_t corresponde a medida da superfície.

Implantes modernos apresentam superfícies modificadas por diferentes técnicas que geram distintas topografias, as quais variam desde a criação de nanotubos sobre o Ti¹⁴, até a aplicação de técnicas de condicionamento ácido ou de jateamento mecânico. O próprio processo de torneamento, frequentemente utilizado para a obtenção do macro desenho do implante, já é uma forma de obter rugosidade superficial. Estas superfícies usinadas ou maquinadas apresentam diferentes características que podem variar desde uma estrutura lisa até uma minimamente rugosa. Por serem os primeiros tipos de superfícies descritas, existem acompanhamentos clínicos demonstrando elevadas taxas de sucesso, mesmo após 20 anos de realizado o procedimento de implantação³¹.

Dentre as técnicas comumente usadas para alterar a superfície de titânio, algumas aderem materiais ao metal em volume e o resultado é uma superfície com protuberâncias. Também tem sido empregada a técnica de subtração de material, a qual resulta, na superfície do Ti, um variado número, diâmetro e profundidade de poros. Dos exemplos de processo subtrativo, além do condicionamento ácido e jateamento descritos acima, podemos citar a técnica de oxidação e ablação a laser. Já entre os processos aditivos, destacam-se a cobertura com materiais ou partículas (hidroxiapatita⁸¹ e vários tipos de fosfatos de cálcio⁶⁷), e a deposição de íons com spray de plasma³⁹.

2.2.1 Processos Subtrativos de Modificação do Ti

O jateamento corresponde a uma abrasão provocada por partículas (geralmente Al_2O_3 e TiO_2), as quais são projetadas contra uma superfície e originam diferentes rugosidades e características químicas superficiais no titânio, dependendo da partícula utilizada no processo. Pose-se encontrar, também,

superfícies comerciais apenas jateadas e outras modificadas em combinação com outros métodos.

Vários estudos demonstraram correlação positiva entre incremento de rugosidade e integração óssea para implantes jateados quando comparados com implantes sem tratamento. As rugosidades testadas variavam da seguinte maneira: $R_a = 2,1 \mu\text{m}$ ⁸⁶, S_a acima de $1,2 \mu\text{m}$ ⁵⁴, $R_a = 2,75 \mu\text{m}$ ³⁰, sendo que para os dois últimos estudos, foram utilizadas partículas de Al_2O_3 e TiO_2 . Quando colocados sob função, foi encontrado efeito estimulante para formação óssea nas superfícies jateadas, quando comparado com superfícies usinadas³⁰. Uma vantagem do jateamento com TiO_2 foi relatada por Warren et al.¹²¹ (2002), os quais avaliaram as condições de implantes pelo período de 3 anos. Os autores reportaram uma discreta perda óssea marginal de menos de 1 mm, sendo essa limitada redução do tecido ósseo foi atribuída à rugosidade de superfície.

O Ti é um material altamente resistente à corrosão e perde pouca estrutura quando submetido ao condicionamento com ácidos. Desta maneira, este tipo de tratamento de superfície é comumente utilizado para remover uma pequena quantidade do material, resultando em depressões superficiais. Ácidos clorídrico, sulfúrico e fluorídrico têm sido usados como agentes químicos para modificar o Ti. Esta técnica de modificação tem sido investigada e foi observado que o osso formado ao redor de superfícies condicionadas ($\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$) era mais duro e sólido quando comparado com o osso vizinho a implantes usinados¹⁶. Após três anos sob carga funcional, foi observado uma melhor osseointegração de implantes duplamente condicionados ($\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$) e submetidos a tratamento térmico quando posicionados em osso esponjoso ou de baixa qualidade⁵⁹. Os diferentes processos de condicionamento da superfície de titânio criaram similares perfis de rugosidade em escala micrométrica. Em 2007, Att et al.⁷ demonstraram a função normal dos osteoblastos in vivo, sendo que a osseointegração não foi afetada pelos diferentes protocolos de condicionamento. Cho et al.²⁰ (2003) demonstraram a semelhança no torque reverso para remoção entre superfícies de titânio tratadas com diferentes tipos de ácido (Hidrofluorídrico e $\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$) e diferença quando as duas superfícies condicionadas foram comparadas com superfícies sem tratamento.

O jateamento abrasivo e o condicionamento podem ser usados em conjunto para alterar a rugosidade das superfícies. Teoricamente, a justificativa para combinar estes métodos é por que o processo de jateamento confere uma rugosidade ótima para a fixação, sendo que um condicionamento adicional alisa os possíveis picos afiados. No intuito de investigar a influência do jateamento abrasivo na estimulação biológica e ancoragem do implante à longo prazo, Szmukler-Moncler et al.¹⁰⁸ (2004) compararam dois implantes com rugosidade de superfície diferente (jateada com alumina mais condicionada com HCl/H₂SO₄ - R_a = 1,53 μm ou apenas condicionada R_a = 0,90 μm). Os autores concluíram que o jateamento abrasivo incrementou a ancoragem em 49,3%. Após dois meses de implantados em osso humano, peças de titânio jateadas com TiO₂ e condicionados com HCl/HNO₃ (R_a = 0,7 μm), apresentaram maior área de contato osso-implante ao serem comparados com implantes apenas usinados⁴¹.

Todos os implantes de Ti contam, por natureza, com uma camada superficial de óxido, a qual participa efetivamente da integração do material ao tecido ósseo. Com a finalidade de melhorar o processo de osseointegração, tem se aumentado a oxidação dos dispositivos implantáveis de Ti mediante uma técnica onde o implante é colocado como ânodo imerso numa solução e submetido à corrente galvânica na presença de certo eletrólito. O resultado da passagem da corrente galvânica é o incremento da camada de óxido. Existe uma relação entre a voltagem usada na anodização de implantes e a incorporação óssea dos mesmos. Foi observado que a aplicação de uma voltagem de 500 ou de até 550 V (R_a = 5,2 μm e 3,8 μm, respectivamente) aumenta a porcentagem de contato osso-implante após três meses de cicatrização. Consequentemente, os valores de torque para remoção também foram aumentados, principalmente quando comparado com implantes onde se empregou uma menor voltagem para induzir a modificação na superfície do Ti²². No entanto nem todos os estudos confirmam melhoras no desempenho de implantes oxidados. Em 2002, Giavaresi et al.³⁶ compararam implantes de Ti modificados por jateamento e condicionado (R_a = 0,80 μm) com implantes modificados por oxidação, usando-se para isto, fosfato de cálcio como eletrólito (R_a = 1,17 μm). Após oito e doze semanas de realizado os implantes em osso femoral de ovelhas, os autores observaram que não houve diferenças entre os grupos e nem entre períodos nos testes mecânicos, histomorfométricos e de dureza.

Resultados contraditórios foram encontrados pelos mesmos pesquisadores após 8 e 12 semanas nos testes de força para remoção de implantes modificados pela mesma técnica³⁵.

Um outro método subtrativo de modificação da superfície do Ti é a ablação com laser, a qual será discutida, em detalhes, posteriormente em um tópico específico. Porém, cabe discorrer, neste momento, que superfícies de Ti irradiadas com laser aumentam a viabilidade celular e a proliferação de osteoblastos¹⁰⁰, provavelmente devido à favorável topografia superficial criada por este tipo de tratamento. Quando implantes irradiados com laser foram implantados em coelhos, ocorreu uma maior ancoragem óssea quando estes implantes irradiados com laser foram comparados com implantes sem tratamento de superfície⁸⁵. Também foi demonstrado que a irradiação do Ti com laser pode ser combinada com métodos adicionais, o que pode determinar resultados satisfatórios *in vitro* e *in vivo*⁵².

2.2.2 Processos Aditivos para Modificação do Ti

O tratamento de implantes de Ti com hidróxido de sódio (NaOH) produz uma camada de gel de composição híbrida sódio-titânio sobre a superfície, enquanto o tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) cria uma camada de gel chamada de titânia (TiO₂). Estes géis podem ser usados isoladamente⁷⁷ ou em combinação com outros métodos⁸¹ para depositar materiais como (hidroxiapatita (Ha) na superfície do implante. Meirelles et al.⁷¹ (2008) demonstraram a ocorrência de alterações físico-químicas e topográficas no Ti modificado por adição de Ha pelo método de gel, o que resultou no aumento na retenção óssea dos implantes.

A deposição de fosfato de cálcio (CaP) na superfície do Ti é um tipo de modificação que pode aumentar o embricamento mecânico com o osso e acelerar o reparo tecidual. Mendes et al.⁷² (2007) demonstraram maior adesão óssea em implantes (Ti₆Al₄V) recobertos com nano-cristais de fosfato de cálcio, quando comparados a implantes sem este tipo de recobrimento. Os autores atribuíram essa melhor adesão osso/implante ao aumento na complexidade da topografia superficial criada. Depois de oito semanas, implantes oxidados e recobertos com CaP mostraram uma maior osseointegração em comparação com implantes

simplesmente oxidados⁶⁷. Como resultado de um estudo clínico randomizado desenvolvido em humanos por Goene et al.³⁷ (2007), foi demonstrado que a adição de CaP influi na quantidade linear de novo osso em contato com os implantes depois de 4 e 8 semanas do procedimento operatório realizado na maxila.

Na técnica de deposição por spray de plasma (TPS, *titanium plasma-spray*), aplica-se partículas de titânio na superfície do implante, originando assim uma superfície de configuração irregular. No estudo pioneiro desenvolvido por Vercaigne et al.¹¹⁷ (1998), os autores concluíram que as modificações provocadas pelo método TPS não leva à diferenças na resposta óssea pela força do embricamento mecânico mostrada quando os implantes foram colocados em tibia de ovelha. Quando foi comparada a resposta óssea a implantes com diferentes rugosidades ($R_a = 16,5$; $21,4$; e $37,9 \mu\text{m}$), tratados com TPS ou submetidos ao jateamento, foi demonstrado a ausência de diferenças histológicas na interface osso/implantes¹¹⁶. No entanto, outros estudos encontraram que as superfícies TPS são melhores integradas ao osso. Num destes estudos, Gotfredsen et al.³⁹ (2000) compararam a ancoragem óssea de implantes sem modificação superficial ($R_a = 0,37\mu\text{m}$), jateados ($R_a = 1,05$; $1,16$; e $1,45 \mu\text{m}$) e tratados com TPS ($R_a = 3,54\mu\text{m}$). Após os períodos de 6, 9 e 12 semanas de realizada a implantação em tecido ósseo de coelhos, os autores demonstraram que as superfícies jateadas e as modificadas com TPS apresentavam a melhor ancoragem óssea. Outro estudo mostrou que três meses após a implantação, não ocorreu aumento nas medições de massa associadas a implantes tratados com TPS. Porém, quando o TPS foi associado com Ha, um maior contato do implante com o osso aconteceu¹¹⁵. Lee et al.⁶⁵ (2004) relataram que quando o tratamento com TPS é associado a outros tipos de tratamento de superfície, pode-se obter crescimento ósseo precoce, o que acelera o processo de cicatrização local.

Para obtenção de uma nanotopografia na superfície do Ti, vários métodos físicos, tais como a compactação de nanopartículas e a deposição iônica, tem sido propostos. Dentre estes dois métodos, o método de compactação de nano e micropartículas de TiO_2 é o mais comumente usado, pois origina superfícies de nano e micro escalas no Ti tratado. A deposição de nano partículas sobre as superfícies do Ti pode chegar a modular a osseointegração, alterando as respostas celulares e teciduais⁷⁴. As maiores preocupações com estes métodos para a criação

de nanotopografia por deposição é a possibilidade de ocorrer aglomeração de partículas durante o processo de recobrimento. Este efeito negativo resulta numa formação topográfica desigual, especialmente quando as nanopartículas são usadas em grandes quantidades.

Dentre os métodos químicos para obter características nanométricas, pode-se citar o tratamento de implantes com ácidos, a peroxidação e a oxidação ácida (ácido hidrofúorídrico). Mante et al.⁷⁰ (2004) relataram que após o tratamento do Ti com H₂O₂/HCl, ocorre aumento na capacidade de absorção de peptídeos pela superfície, particularmente devido à oxidação e conseqüente criação de uma topografia nanométrica com características amorfas.

Adicionalmente, grupos químicos funcionais podem ser aderidos à superfície do Ti e serem usados como enlaces covalentes que aderem a fatores de proliferação celular e fatores relacionados ao osso, como por exemplo os fatores de crescimento. A adsorção das proteínas presentes no plasma sanguíneo (albuminas, fibrinogênio e imunoglobulinas) pelo Ti é de crucial importância imediatamente após o procedimento do implante ósseo. Após as proteínas serem adsorvidas, elas atuam como interface entre a superfície do implante e as células, criando um substrato adequado para a osseointegração. Tang et al.¹¹⁰ (1999) demonstraram que a adsorção não é afetada apenas pela textura da superfície de Ti, mas também pela sua hidroafinidade e característica química. Este fator é de especial importância para o Ti, pois o processo de adsorção é mais lento nas superfícies de Ti quando comparado com outros materiais, como o aço inoxidável¹⁸, o que reduz a adesão e interação com células sanguíneas. Superfícies de implantes de Ti têm sido modificadas no intuito de melhorar as propriedades de adsorção. Assim, a criação de nanoestrutura sobre a superfície capaz de promover a absorção tem sido proposta como uma maneira de acelerar a osseointegração⁹¹.

O método mais comumente usado para criar nanotopografia na superfície dos implantes é o de jateamento complementado pelo condicionamento ácido (SLA). Este processo confere à superfície do Ti a formação de macro e microtopografias decorrentes do jateamento, sendo que as micro- e nanoestruturas se formam em decorrência do condicionamento ácido. A maior limitação do SLA se deve ao fato de que este é um processo randomizado e de difícil controle na uniformidade e

distribuição das nanoestruturas na superfície dos implantes. Com a proposta de superar esta limitação e gerar implantes com melhor distribuição de nanoestruturas na superfície de Ti, tem sido realizado uma cobertura complementar do dispositivo com Ha, através da aplicação do spray de plasma ou com a deposição de fosfato de cálcio por meio da evaporação com feixe de elétrons. No entanto, estes métodos são difíceis de serem aplicados em implantes com formatos complexos ou que apresentem depressões, além de elevar significativamente o custo final dos dispositivos.

Cobrir a superfície de metais, tais como o Ti, com filmes de polímeros funcionais, é também uma maneira eficaz de melhorar a osseointegração enquanto diminui-se a corrosão do metal^{25, 46, 127}. Os polímeros usados neste técnica possuem várias vantagens, sendo a maior delas a capacidade de ser usados para carga e liberação de agentes terapêuticos, como fatores estimuladores de formação óssea. Porém, também existem algumas desvantagens para esta técnica, tais como o potencial de liberar compostos potencialmente prejudiciais aos tecidos dos pacientes submetidos ao implante. Embora esta seja a principal desvantagem de se utilizar polímeros no tratamento do Ti, o que limita a disseminação desta técnica, há alguns tipos específicos de procedimentos propostos para modificar as superfícies do Ti e assim melhorar as propriedades do material e sua osseointegração mesmo envolvendo diferentes polímeros na técnica. A polimerização eletroquímica tem sido usada para depositar filmes de diferentes polímeros em Ti e suas ligas²⁶, resultando em superfícies com melhores propriedades anticorrosivas. Vários têm sido os métodos utilizados para liberar fatores bioquímicos na interface entre a superfície do implante e o tecido ósseo. Estes métodos incluem a união covalente de moléculas bioativas, tais como colágeno tipo I⁷⁹ ou do peptídeo RGD⁹⁹, diretamente nos filmes de polímeros. Além de aprimorar a resistência à corrosão e conferir propriedades bioativas ao implante, a cobertura com filmes de polímeros estimula a vascularização local. Como os implantes metálicos apresentam pouco ou nenhum suporte para a revascularização do novo osso que será formado ao seu redor, já foram incluídas moléculas biologicamente ativas, como o VEGF²⁷ (fator de crescimento vascular endotelial, uma proteína envolvida na angiogênese e na vasculogênese) ou até uma associação de VEGF e colágeno¹²⁶, o que favoreceu a vascularização ao redor dos implantes.

2.3 Modificação da Superfície de Titânio com Laser Pulsado de Alta Potência

Tratar a superfície do Ti com laser é um método efetivo para obter superfícies biologicamente favoráveis a osseointegração¹⁰⁰. A modificação da superfície de implantes de titânio através do uso de laser é causada pela ablação do metal. Este processo remove material da superfície sólida em massa/volume, através da aplicação de uma irradiação com feixe de laser específico, onde em baixas intensidades uma pequena quantidade do material na superfície de trabalho pode ser evaporada quando esquentada rapidamente pela energia absorvida do laser. Já em altas intensidades, o Ti é convertido em plasma e, quando a irradiação cessa, a superfície tende a se solidificar⁶⁸. Esta modificação superficial foi desenvolvida dentro da área de engenharia de materiais para diferentes objetivos⁸⁷.

Para ser gerado um feixe de laser é necessário que ocorra a estimulação de elétrons de certo elemento químico desde seu estado natural, induzindo-os a um estado de maior carga energética. O retorno destes elétrons ao seu estado natural resulta na emissão de fótons, liberando a energia que foi necessária para esta transição⁴. O raio de fótons é então transportado através de um material semitransparente, o que resulta em luz altamente direcional e monocromática, permitindo assim uma focalização extremamente precisa da área que se deseja irradiar. Este fenômeno faz com que seja possível aplicar uma determinada energia sobre a estrutura de Ti, elevando a temperatura local, o que ocasiona sua fusão. Em consequência disto, gera-se uma modificação físico-química na superfície do material irradiado¹¹³. Esta energia absorvida do feixe de laser, a qual é parcialmente convertida em energia térmica, gera uma série de efeitos na superfície do Ti, como derretimento, vaporização, ondas de choque, entre outras.

A irradiação do titânio é um método de modificação controlável e pode ser aplicado à produção em massa. O tratamento com laser permite criar formas e texturas na superfície do Ti com precisão em uma escala de micrometros. Müller et al.⁷⁸ (2006) utilizando esta tecnologia de irradiação com laser, criaram poros com formato cilíndrico bem definidos que variavam na faixa de 100 μm e tinham a mesma medida tanto em diâmetro como em altura. Hirao et al.⁵⁰ (2005) também demonstraram a formação de canais de 500 μm de largura em implantes de titânio

(Ti6Al4V) ou cromo cobalto (CoCr) quando da utilização do laser de ítrio, aumentando a força de união e resistência ao desprendimento por cisalhamento.

Para que exista uma adequada integração dos dispositivos implantáveis de Ti, a superfície dos mesmos deve ser invariavelmente estéril e também estar livre de contaminantes. Usando outros métodos de modificação de superfície, como por exemplo o de erosão com faísca, observou-se um aumento da rugosidade do Ti, porém não se conseguiu pureza de superfície. Após 12 semanas os pesquisadores não encontraram diferença nos valores de torque para remoção quando se comparou com implantes de rugosidade menor¹²⁴. Desta forma, foi demonstrando que mesmo aumentando a rugosidade, a pureza da superfície é indispensável quando se trata de melhorar o processo de integração óssea. No estudo de Kato et al.⁵⁶ (1998), foi observado, por meio da irradiação do Ti com laser de alta potência (CO₂), que é possível eliminar corpos estranhos e contaminantes bacterianos, os quais podem estar presentes na superfície do metal. Desde que a modificação de superfície com laser consiga elevar a rugosidade da estrutura irradiada e ao mesmo tempo eliminar contaminantes bacterianos do local⁵⁶, esta poderia ser considerada uma técnica eficaz para tratar e esterilizar implantes.

A superfície resultante da irradiação com laser é caracterizada pela formação de óxidos e nitratos na área⁴⁴. Estes compostos são altamente favoráveis em termos de osseointegração, tal como anteriormente relatado. Além disso, a presença de O e N na superfície do Ti resulta numa nanoestrutura com maior área de superfície, elevada dureza e resistência à corrosão. As alterações estruturais de superfície induzidas por este tipo de tratamento têm influência direta na velocidade da osseocondução, o que pode resultar num processo de osseointegração mais rápido^{50, 52}.

A propriedade hidrofílica das superfícies dos implantes é um fator de grande importância na qualidade da osseointegração dos implantes de Ti⁹⁷. Recentemente, Forsgren et al.³⁴ (2012) demonstraram que a irradiação de superfícies de Ti com laser (pulsado de Nd:YAG) induz propriedades hidrofílicas no Ti, por meio de uma conversão iônica que acontece na superfície do óxido, caracterizada pela conversão de Ti⁴⁺ em Ti³⁺. Num estudo anterior, conduzido Dahotre et al.²³ (2010), os autores já haviam determinado que o uso do laser aumenta a capacidade de molhamento

das superfícies de Ti, sendo que esta ação foi atribuída ao formato tridimensional e característica química de superfície do material irradiado.

As superfícies criadas pela ação do laser pulsado de alta potência têm a capacidade de influenciar as células no espalhamento e sua orientação local¹⁰¹. No intuito de saber qual era a influência das porosidades formadas no Ti modificado por laser, Sinjari et al.¹⁰⁰ (2012) compararam as superfícies do Ti sem modificação e modificadas mediante jateamento. Os autores observaram que, além de promover mudanças morfológicas, as superfícies tratadas com laser aumentaram a viabilidade, adesão e proliferação de osteoblastos, fatores estes que apresentam papel importante no processo de osseointegração.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como proposta, avaliar a capacidade de uma superfície de titânio comercialmente puro, submetida a modificação topográfica, física e química através da irradiação com laser pulsado de alta potência, de induzir a diferenciação de osteoblastos isolados de calvária de camundongo, bem como os efeitos desta superfície sobre a síntese e deposição de componentes da matriz extracelular e o potencial de mineralização desta.

A superfície experimental de titânio foi caracterizada em MEV, perfilometria óptica e pela análise dos elementos químicos formados após a irradiação. Foram realizados experimentos para avaliação da formação de nódulos de mineralização (vermelho de Alizarina), proliferação celular (ensaio de MTT), atividade da enzima fosfatase alcalina (ensaio ALPase), bem como para quantificação relativa de fatores de transcrição de osteoblastos e de proteínas da matriz óssea (qPCR). Finalmente, o espalhamento e morfologia dos osteoblastos cultivados sobre a superfície de titânio foram analisadas em MEV.

4 MATERIAL E METODO

Discos de titânio comercialmente puro (Ticp) grau 4 (Titanews, Barueri, SP, Brasil), com dimensões padronizadas (15,0 mm de diâmetro e 2,0 mm de espessura) foram utilizados neste estudo. Estes discos foram mecanicamente polidos, sob lubrificação com água destilada usando lixas abrasivas tamanho 600 e 1200 por 2 minutos respectivamente para assim obter superfícies de rugosidade uniforme. Posteriormente, todos os discos foram limpos em ultrassom (Ultrasonic 1440 Plus, Odontobras, Ribeirão Preto, SP, Brazil), imersos em acetona PA (Qhemis, Indaiatuba, SP, Brazil), água deionizada, etanol 100% (Qhemis) e finalmente lavados com água deionizada. Então, os discos foram secos sob calor em uma incubadora (Orion 515, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) a 37°C. O grupo controle foi identificado como usinado (U) e o grupo experimental como laser (L).

4.1 Irradiação do Ti

Uma das superfícies de cada um dos discos do grupo experimental foram modificadas pelo processo de ablação, provocado pela ação do laser Yb:YAG (Ytterbium-doped, Yttrium aluminium garnet $Y_3Al_5O_{12}$ laser) pulsado de alta potência (Omnimark 20F, Ominitek Tecnologia Ltda, SP, Brasil). A irradiação foi realizada dentro de uma atmosfera ambiente, a uma distância focal fixa, com o feixe perpendicular à superfície do Ti e em forma de varredura. Os parâmetros de irradiação foram: velocidade da passagem de 100 mm/s, potência de 150 mJ, frequência do pulso de 30 kHz, comprimento de onda de 1064 nm e distância entre varreduras de 0,1 mm. Juntos, os discos do grupo controle (U) e experimental (L) foram esterilizados em autoclave por 30 minutos a 135°C (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil).

4.2 Caracterização da Superfície.

Foram obtidos interferogramas tridimensionais (n=9) por perfilometria óptica (Wyko Nt1100, Veeco instruments, Inc. Plainview, NY, USA). Os espécimes foram

analisados sob uma magnificação de 20,5x, e o valor de R_a de cada superfície foi calculado usando o próprio software do aparelho (Visio 3.0, Veeco instruments, Inc. Plainview, NY, USA). Para obter uma caracterização mais completa, tanto da morfologia como da composição química, ambas as superfícies dos discos foram avaliadas com microscópio eletrônico de varredura (MEV - JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, Tóquio, Japão) (n=3), sendo que os elementos químicos presentes sobre eles foram quantificados por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX).

4.3 Isolamento de Células de Calvária de Camundongo

Osteoblastos da calvária de camundongos (C57/Bl6) foram isolados 2 ou 3 dias após o nascimento, utilizando-se para isto o método de digestão sequencial enzimática, como previamente descrito por Bonekamp et al.¹³, previa aprovação pelo comitê de ética (anexo 1). O método consiste em dez lavagens sequenciais das calvarias usando soluções enriquecidas com EDTA (três primeiras lavagens) e colagenase (sete seguintes lavagens), no intuito de dissolver a matriz que envolve as células fenotipicamente caracterizadas como pré-osteoblastos devido à sua capacidade de expressar fatores de transcrição, formar nódulos de mineralização e expressar fosfatase alcalina. A população de células usada neste estudo foi coletada da sexta à décima lavagem, sendo as quatro anteriores descartadas. As células obtidas foram semeadas com meio de cultura (α -MEM - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco) e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 μ g/mL estreptomicina, Gibco) em garrafas plásticas (Techno Plastic Products AG, Schweiz, Suíça) de 25 cm² de superfície, as quais foram mantidas em incubadora umidificada na temperatura de 37°C e numa atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar.

Após 72 horas, as células em cultura foram lavadas uma vez com solução salina tamponada (PBS) e destacadas do fundo da garrafa usando 3,5 mL de tripsina 0,025% (Gibco) pré-aquecida a 37°C. Subsequentemente, as células foram semeadas (5×10^4 células por poço/disco) sobre cada um dos discos de Ti previamente alocados no fundo de placas de acrílico esterilizadas de 24 poços (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Para a realização desta etapa experimental, o

α -MEM foi suplementado com β -glicerolfosfato (10 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e ácido ascórbico (2 mM Sigma-Aldrich). O meio de cultura osteogênico foi substituído a cada 72 horas, sendo que as placas foram mantidas em incubadora de CO₂ umidificada.

4.4 Avaliação Morfológica das Células em Cultura

As células cultivadas sobre os discos de Ti pelos períodos de 3, 7, 14 dias foram morfológicamente caracterizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV - JEOL-JMS-T33A) (n=3). Para este tipo de análise, os discos com as células aderidas em sua superfície, foram removidos dos compartimentos das placas de acrílico. Então, as células foram cuidadosamente lavadas por duas vezes com PBS e imediatamente fixadas por 30 minutos numa solução de glutaraldeído 2,5%. Após serem pós-fixadas por 10 minutos em tetróxido de ósmio 1%, as células foram submetidas ao processo de desidratação, através de trocas ascendentes de etanol em diferentes concentrações (50, 60, 70, 80, 90, 95 e 100%). Concluída a etapa de desidratação, os discos com as células na sua superfície foram imersos na solução de 1,1,1,3,3,3- hexametildisilano (HMDS - ACROSS Organics, New Jersey, NY, USA) por 30 minutos. Finalmente, os discos foram mantidos num desumidificador por 24 horas e então submetidos à cobertura com ouro (SC7620 Mini Sputter Coater/Glow Discharge System, Quorum Technologies Ltd, West Sussex, UK).

4.5 Quantificação de Nódulos de Mineralização

Para avaliar a quantidade de cálcio depositado pelas células, foi realizado o ensaio de vermelho de alizarina nos períodos de 7 e 14 dias após o cultivo celular (n=4). Para isto, as células aderidas aos discos referentes aos grupos U e L foram cuidadosamente lavadas duas vezes com PBS pré-aquecido a 37°C e então fixadas com 1 mL de etanol 70% por 30 min. Cada um dos espécimes (discos/células) foram então lavados, por mais duas vezes, com água deionizada e corados com 1mL da solução de vermelho de alizarina (40 mM, pH 4,2 - Sigma-Aldrich), a qual foi aplicada, individualmente, em cada compartimento da placa de acrílico. Os espécimes foram mantidos em contato por 30 minutos com o corante em

temperatura ambiente e sob leve agitação (VDRL Shaker, Biomixer, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O corante não incorporado às células foi aspirado e os discos lavados duas vezes com água deionizada para remover o excesso. Os nódulos de mineralização foram então fotografados (apêndice 1) e posteriormente dissolvidos com 1 mL de cetilpiridíneo 10% (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos sob agitação em temperatura ambiente. Então, três alíquotas de 100 μ L obtidas de cada compartimento, foram transferidas para placas de 96 poços e a absorbância foi medida numa leitora de microplacas (Power Wave XS Microplate Reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) a 562 nm.

4.6 Medição da Atividade da Fosfatase Alcalina

Depois de ter semeado as células sobre os discos de Ti (grupos U e L) e realizado o cultivo delas por 7 e 14 dias, o conteúdo celular total foi lisado, usando-se para isto 500 μ L de uma solução detergente (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,5% Nonidet P40). Esta atividade foi determinada medindo a liberação de timolftalina do fosfato de timolftalina usando um teste comercial (Labtest Diagnostica SA, Belo Horizonte MG, Brasil). A proteína total nos lisados foi quantificada através do emprego de um ensaio à base de ácido bicinônico (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford IL USA), sendo que 20 μ g de proteína total de cada espécime foram utilizadas para fazer a medição da atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALPase).

Para testar a atividade da enzima, foram diluídos 20 μ g de proteína total (alíquota de volume variável de acordo à concentração de proteína presente em cada um dos espécimes) e 10 μ L de substrato (monofosfato de timolftaleína 22 mmol/L) em PBS (dietilamina 0,3 mmol/mL, pH 10,1), sendo que esta solução foi incubada durante 40 minutos a 37°C. Depois foram adicionados 100 μ L do reagente de cor (Na_2CO_3 0.09 mmol/ml, NaOH 0.25 mmol/ml) em cada um dos compartimentos, sendo a placa levada para incubação por um período adicional de 10 min (37°C) para garantir uma adequada reação. Imediatamente após este procedimento, foi realizada a leitura da absorbância em leitora de microplacas (Power Wave XS Microplate Reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) a 562 nm. A atividade da ALPase foi calculada com base na curva padrão construída

usando substrato de timolftaleína (45 UI/L) na concentração de 0,0122 a 0,4 μmol de timolftaleína/h/mL.

4.7 Ensaio para Determinar o Metabolismo Celular

O ensaio de MTT foi realizado após 1, 3 e 7 dias de cultura das células sobre os discos de Ti irradiados ou não. Esta técnica foi usada para determinar a viabilidade das células semeadas por diferentes períodos sobre os discos. O meio de cultura inicialmente em contato com as células foi substituído por 900 μL de um novo α -MEM (Gibco) ao qual foi acrescentado 100 μL de uma solução de 5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich) em PBS. Após 4 horas de incubação das células em contato com a solução de MTT, esta foi cuidadosamente aspirada, sendo que o possível resíduo do sal foi eliminado através de lavagem dos compartimentos com PBS aquecido (37°C). Então, foram adicionados 700 μL de isopropanol acidificado (100 μL de HCl 0,04 N em isopropanol) em cada um dos compartimentos com o intuito de dissolver os cristais de formazan formados durante a reação do MTT. A placa foi gentilmente agitada durante 5 minutos para dissolver os cristais, sendo que três alíquotas de 100 μL coletadas de cada compartimento foram transferidas para placas de 96. Finalmente, as placas foram levadas para leitura da absorbância a 570 nm, utilizando-se para isto um leitor de microplacas (Power Wave XS Microplate Reader, BioTek Instruments).

4.8 Isolamento do RNA e Análise da Expressão Gênica

A reação de polimerização em cadeia (PCR) quantitativa em tempo real foi utilizada para analisar a expressão, pelas células cultivadas sobre as superfícies de Ti, de genes que codificam os fatores de transcrição *Runx2* e *Sp7* e proteínas específicas da matriz extracelular mineralizada (*Spp1*, *Alpl*, *Col1a1*). Estes experimentos foram conduzidos por 1, 3, 7 e 14 dias. As células aderidas às superfícies de Ti foram lavadas cuidadosamente duas vezes com PBS aquecido (37°C) e o conteúdo total foi lisado usando 500 μL Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), tal como recomendado pelo fabricante. Cada amostra foi quantificada num espectrofotômetro e considerada aceitável quando a absorbância (relação

260/280 nm) atingia 1,8. Posteriormente, foi sintetizado o DNA complementar, através do uso do kit de transcrição reversa High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações de PCR foram realizadas usando sondas de hidrólise validadas (Life Technologies Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil) num termociclador em tempo real (*Step One Plus*, Applied Biosystems). A presença de RNA mensageiro (mRNA) foi determinada após atingir o ciclo de quantificação pelo método da curva padrão, usando como referência o gene *β-actin*. Para cada gene, o nível de expressão pelas células sobre a superfície U dentro de cada período de cultivo, foi arbitrariamente considerado como 100%. A sequência dos *primers* usados nesta etapa do estudo estão demonstrados no Quadro 1.

Quadro 1 - Sequências dos genes avaliados

Gene	Sequencias
Runx2	5'- GCA GTG CCC CGA TTG AGG-3' 5'-CAT ACT GGG ATG AGG AAT GCG -3''
Sp7	5'- TGA GGA AGA AGC CCA TTC AC-3 5'- ACT TCT TCT CCC GGG TGT G-3'
Col1a1	5'- TCC TGA AGG TGC TAT TTA AGA A -3' 5'- TTG GGT CAT TTC CAC ATG C -3'
Spp1	5'- GCT TCT GAG CAT GCC CTC TGA TCAG GA -3' 5'- GTG CAGA AG CTT TTG GTT ACA ACG GTT G -3'
Alpl	5'- GCT GAT CAT TCC CAC GTT TT -3' 5'- CTG GGC CTG GTA GTT GTT GT - 3'

4.9 Estatísticas

Todos os experimentos foram repetidos por três vezes. A análise dos valores referentes aos ensaios de MTT, vermelho de alizarina e da atividade da ALPase, tiveram distribuição não normal (Kolmogorov-Smirnov $p > 0,05$). As diferenças significativas entre os períodos avaliados foram calculadas usando testes não paramétricos (Mann-Whitney). As inferências estatísticas foram baseadas num nível de significância de 95%.

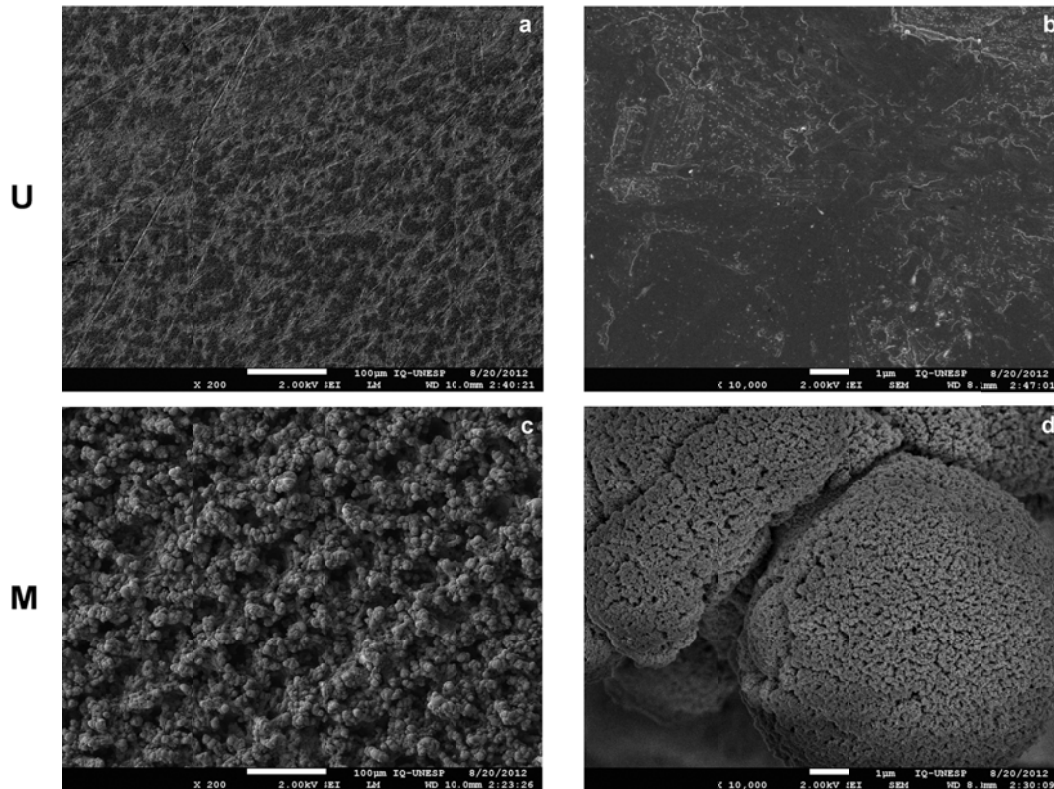
Para os dados dos experimentos de expressão gênica, os quais apresentaram distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,05$), as diferenças significativas foram calculadas usando testes t. O nível de significância foi de 95%.

5 RESULTADO

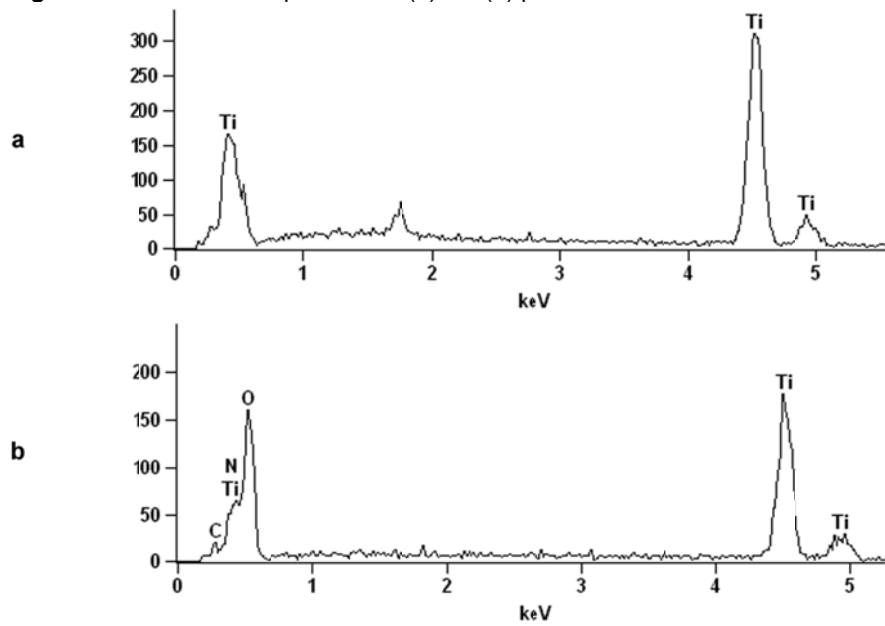
5.1 Irradiação com laser cria superfícies com micro-nano topografias híbridas

A análise sob MEV revelou diferenças topográficas entre as superfícies de Ti submetidas ou não à irradiação com laser. A superfície de Ti usinada (U) se apresentou homogênea e com vestígios da usinagem e rugosidades superficiais menores (Figura 3a,b). Em contrapartida, os discos de Ti irradiados com laser apresentaram, de maneira geral, uma superfície morfologicamente irregular, caracterizada pelo padrão de irradiação com esferas e protruções de diâmetros diferentes (Figura 3c). Observou-se ainda, depressões longitudinais em forma de canal, as quais apresentavam diferentes profundidades e larguras. No entanto, as superfícies rugosas produzidas pela irradiação laser exibiam um padrão morfológico homogêneo e regular. Como característica especial, foi possível observar neste grupo L, quando da análise dos discos de Ti em grande magnificações, a presença de nano-rugosidades secundárias (Figura 3d) no interior de esferas provocadas pela ablação do Ti.

Figura 3 - Fotomicrografias das superfícies U (a,b) e L (c,d) obtidas dos discos de Ti. a) Menor aumento da superfície do disco. MEV, aumento original x 200. b) Detalhe da superfície do disco, onde pode-se observar alguns vestígios da usinagem e rugosidades superficiais menores. MEV, aumento original x 10.000. c) Neste menor aumento da superfície de Ti irradiada com laser, é possível detectar uma estrutura morfológica irregular, com a presença de numerosas esferas e protusões de diâmetros variados. MEV, aumento original x 200. d) Maior aumento da figura anterior, onde pode-se observar detalhe das esferas com micro e nano depressões. MEV, aumento original x 10.000.

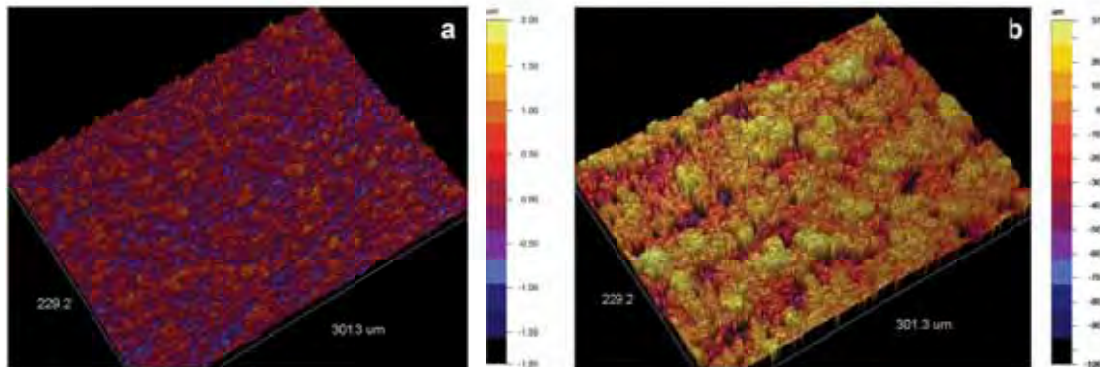


A análise dos substratos pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX) foram consistentes com presença de Ti em ambas as superfícies. No grupo U, foi encontrado apenas a presença de Ti (Figura 4a). Para o grupo experimental L, foram observados picos que caracterizaram a presença local de oxigênio, nitrogênio e carbono, além do próprio titânio na superfície (Figura 4b).

Figura 4 - Análise das superfícies U (a) e L (b) por EDX.

A partir de áreas representativas de cada uma das superfícies de Ti, foram registrados interferogramas tridimensionais. O interferograma da superfície U (Figura 5a) mostra uma superfície com protrusões menores ($R_t = 3,37 \mu\text{m}$), enquanto que na superfície L (Figura 5b), as elevações registradas foram, em média, 41 vezes maiores ($R_t = 143,33 \mu\text{m}$). O cálculo de R_a revelou o valor de $0,3151 \pm 0,006 \mu\text{m}$ para o grupo U, o qual foi nitidamente contrastante quando comparado com o grupo L, onde o valor do R_a foi de $10,57 \pm 0,39 \mu\text{m}$.

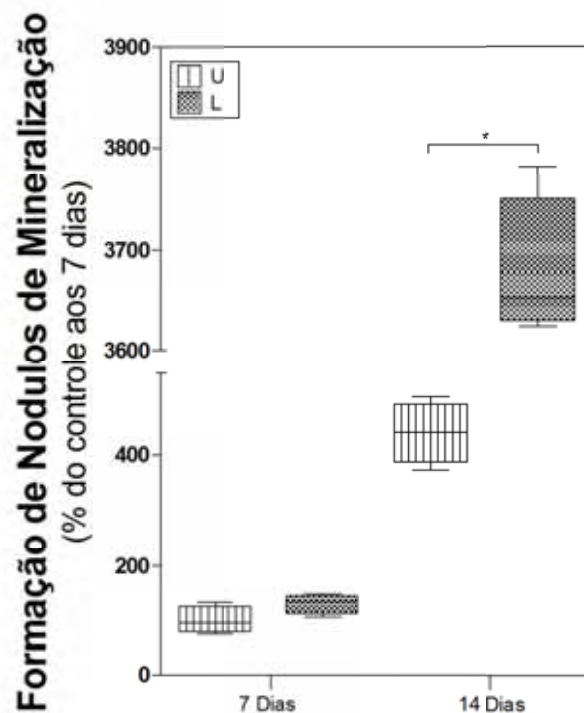
Figura 5 - Interferogramas das superfícies U (a) e L (b). Observe a variação topográfica das superfícies de Ti usinada ou irradiada com laser. Magnificação original x 20,5.



5.2 Indução da Formação de Nódulos de Mineralização pela Superfície L

Tal como descrito anteriormente, a formação de uma matriz extracelular calcificada é característica de osteoblastos maduros e ativos. Após períodos de 7 e 14 dias em cultura, foi possível observar formação ativa de nódulos de mineralização sobre as superfícies de Ti U e L (Figura 6). Sete dias depois de ter semeado as células sobre os discos de ambos os grupos, foi encontrado um aumento precoce, porém não significativo, na formação de matriz mineralizada. No entanto, uma maior formação de matriz foi detectada aos 14 dias sobre a superfície de Ti tratada com laser (L), a qual se apresentou 8 vezes superior do que aquela observada para o grupo U, no mesmo período de avaliação.

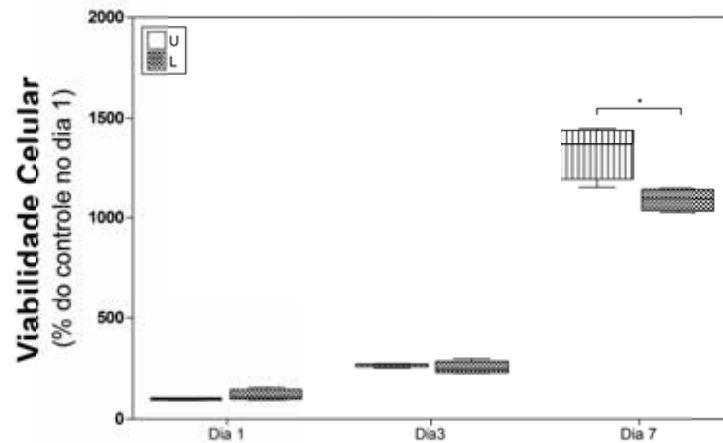
Figura 6 - Porcentagem de nódulos de mineralização formados pelas células em cultura sobre as diferentes superfícies em função do tempo (n=4). As caixas representam 50% dos dados ao redor da mediana, que é mostrada como uma linha horizontal dentro das caixas. Extremos indicam valores mínimos e máximos. * = diferença significativa com valor de $p < 0,05$



5.3 Maior Metabolismo Celular sobre o Titânio não Modificado

O ensaio de MTT foi realizado para avaliar a função mitocondrial das células em cultura sobre as duas superfícies. Houve um incremento gradual na atividade metabólica das células semeadas sobre o Ti usinado (U) desde as 24 horas até os 7 dias pós cultura celular, sendo que o mesmo resultado ocorreu para o grupo onde o Ti foi tratado com laser (L). A atividade metabólica das células cultivadas sobre este último grupo mostrou menores diferenças quando os períodos foram comparados entre si. Foi possível demonstrar que a atividade metabólica foi semelhante entre as superfícies de Ti dos grupos U e L nos períodos de 1 e 3 dias (Figura 7). No entanto, mudança significativa no metabolismo das células foi notada no período de 7 dias, quando esta atividade dos osteoblastos cultivados sobre a superfície U superou àquela observada para a superfície L ($p < 0,05$).

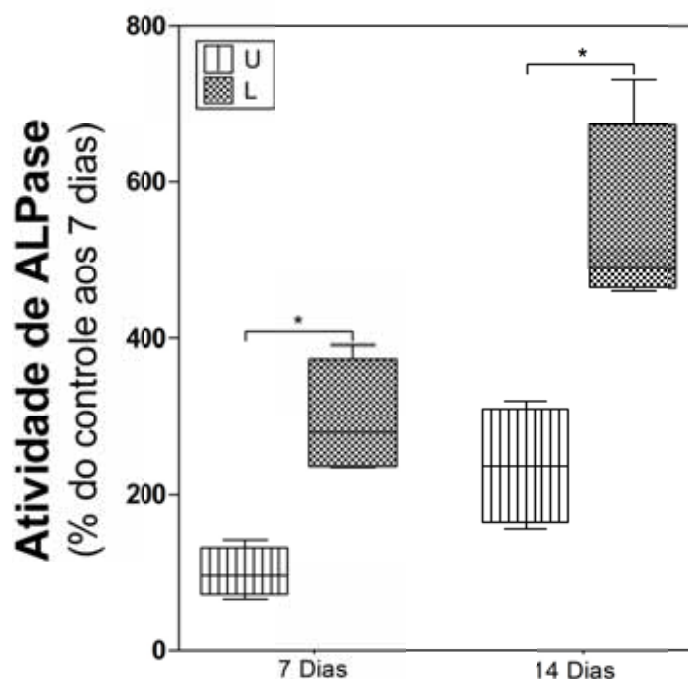
Figura 7 - Atividade metabólica das células cultivadas sobre U e L depois de 1, 3 e 7 dias (n=4). As caixa representam 50% dos dados ao redor da mediana, que é mostrada como uma linha horizontal dentro das caixas. Extremos indicam valores mínimos e máximos. Diferencias significativas entre grupos marcadas com * ($p < 0,05$).



5.4 Atividade da ALPase é estimulada pelo Ti modificado com Laser

A atividade da ALPase, enzima que apresenta papel fundamental no processo de mineralização da matriz óssea e é característica de osteoblastos ativos, foi aumentada pelas células cultivadas em contato com a superfície de Ti tratada com laser, quando comparado com as células cultivadas sobre a superfície de Ti usinada (U) (Figura 8). Desde o 7 até os 14 dias, esta atividade foi aumentada em media 1,83 vezes no grupo U, sendo que para o grupo L, o aumento foi de 2,36 vezes. Comparando a atividade de ALPase dentro dos períodos, foram encontrados, em ambos os grupos, aumentos significativos ($p < 0,05$), sendo que este foi sempre superior para o grupo L.

Figura 8 - Quantificação da atividade da ALPase pelas células semeadas após 7 e 14 dias (n=4). As caixas representam 50% dos dados ao redor da mediana, que é mostrada como uma linha horizontal dentro das caixas. Extremos indicam valores mínimos e máximos. Diferenças significativas entre grupos marcadas com * ($p < 0,05$).



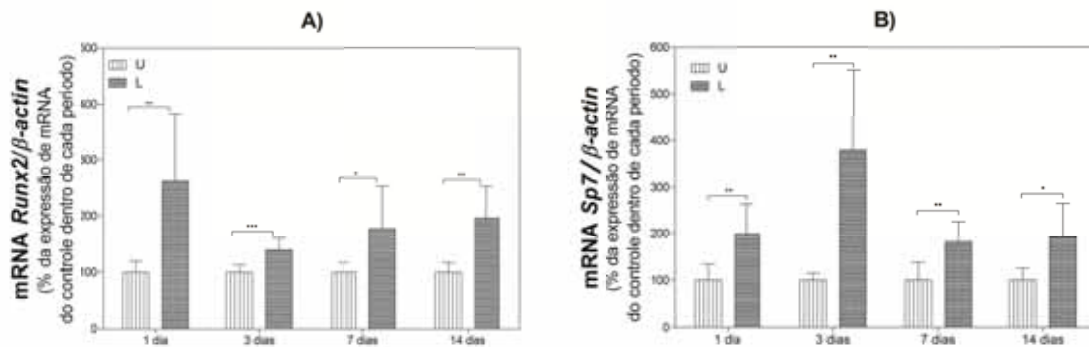
5.5 Genes associados à diferenciação e maturação de Osteoblastos foram estimulados pela Superfície L

Com o objetivo de avaliar a maturação das células em cultura, bem como o fenótipo osteoblástico das células obtidas da calvária de camundongos e cultivadas em meio osteogênico, analisamos vários genes que codificam proteínas e fatores de transcrição que sabidamente estão associados a diferentes etapas de maturação do osteoblasto.

Os níveis de expressão gênica dos fatores de transcrição *Runx2* (Figura 9a) e *Sp7* (Figura 9b) foram regulados positivamente pela superfície L desde as 24 horas até os 14 dias de cultura. Para o gene *Runx2*, a maior diferença (2,64 vezes) ocorreu após 24 horas em cultura. Posteriormente, a diferença foi de 1,39; 1,78 e 1,97 vezes para os períodos de 3, 7 e 14 dias, respectivamente. Já a expressão de

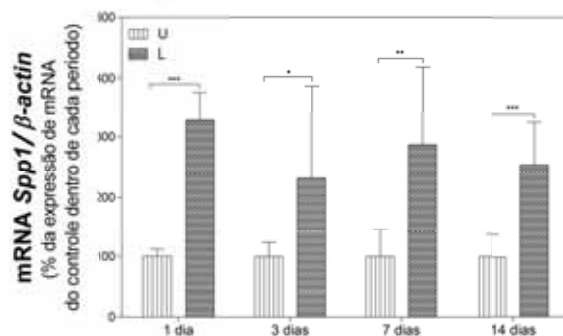
Sp7 foi significativamente aumentada em 1,98; 3,79; 1,81 e 1,91 vezes nos períodos de 1, 3, 7 e 14 dias, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 9 - Análises da expressão gênica dos fatores de transcrição Runx2 (a), *Sp7* (b), por osteoblastos em cultura ($n=8$). Significância estatística foi comparada entre os grupos. (* = $p < 0,05$), (** = $p < 0,005$), (***) = $p < 0,001$).



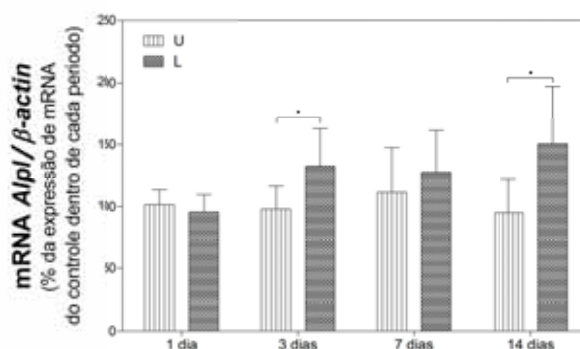
A expressão relativa de mRNA do gene *Spp1*, também conhecido como osteopontina, pelos osteoblastos em cultura, foi notavelmente aumentada pelas células semeadas sobre a superfície de Ti irradiada com laser em todos a os períodos de tempo avaliados (Figura 10). No primeiro período (24 horas), a expressão do gene foi estimulada em 3,28 vezes, caracterizando o maior aumento nesta etapa do estudo. Aos 3, 7 e 14 dias o aumento a expressão do gene *Spp1* foi de 2,33; 2,86 e 2,53 vezes, respectivamente.

Figura 10 - Análises da expressão do gene codificante para a proteína da matriz extracelular osteopontina (*Spp1*) pelas células em cultura (n=8). Significância estatística foi comparada entre grupos. (* = $p < 0,05$), (** = $p < 0,005$), (***) = $p < 0,001$).



O gene *Alpl*, o qual transcreve a enzima fosfatase alcalina, foi estimulado positivamente nas células cultivadas sobre os discos de Ti irradiados com laser (L), particularmente nos períodos de 3 e 14 dias (Figura 11). No período de 24 horas, não foram encontradas mudanças significativas na expressão do gene *Alpl* quando as superfícies U e L foram comparadas entre si. Porém, aos 3 dias o aumento da expressão do gene de *Alpl* foi, em média, de 1,84 vezes e voltou a não ser diferente no período de 7 dias. No entanto, no último período avaliado (14 dias), a expressão *Alpl* aumentou 1,57 vezes.

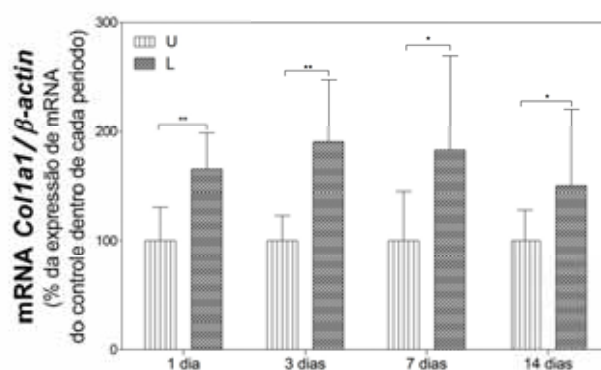
Figura 11 - Análises da expressão do gene codificante da fosfatase alcalina (*Alpl*) pelos osteoblastos em cultura (n=8). Significância estatística foi comparada entre grupos. (* = $p < 0,05$).



A expressão do gene que codifica o colágeno tipo 1 (*Col1a1*) foi estimulada também desde as 24 horas até os 14 dias pelas células em contato com a superfície L (Figura 12). No primeiro período (24 horas), a expressão gênica foi estimulada

pela superfície L em 1,65 vezes ($p < 0,005$), sendo que aos 3 dias este aumento foi sustentado e aumentado para 1,9 vezes ($p < 0,005$). No período de 7 dias de contato com L, a expressão de *Col1a1* pelas células foi estimulada em 1,82 vezes quando comparada com a superfície U ($p < 0,05$). Já num último período (14 dias), o incremento foi de somente 1,49 vezes ($p < 0,05$).

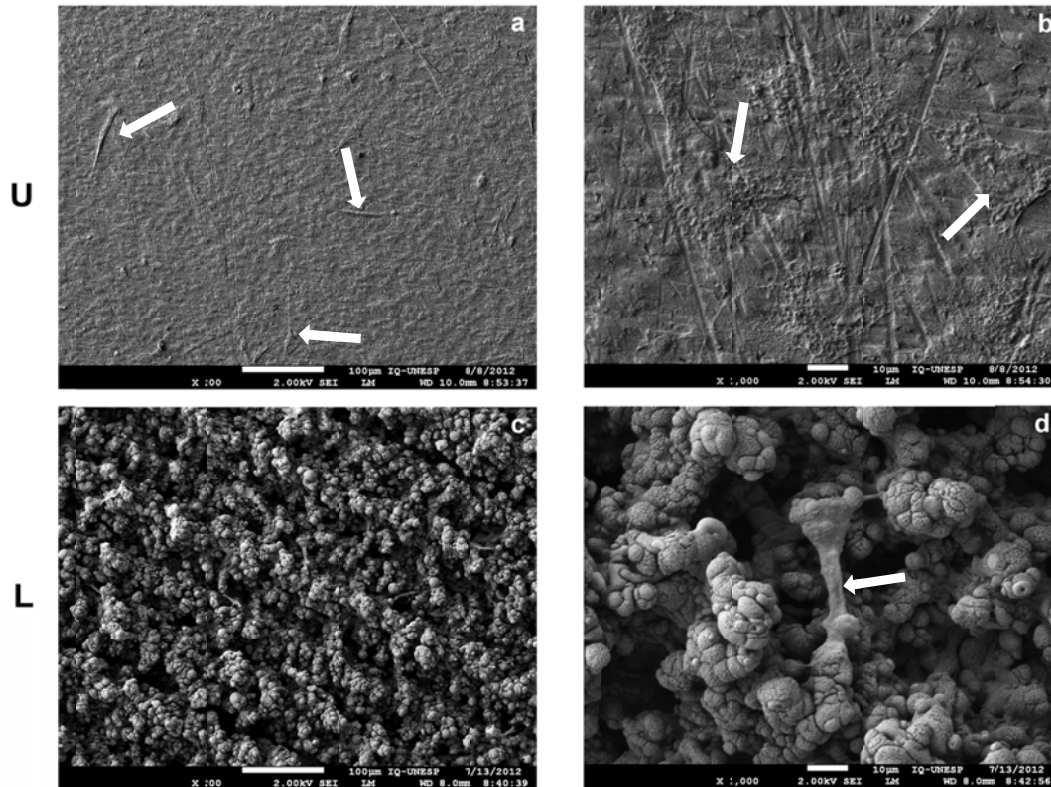
Figura 12 - Análises da expressão do gene codificante para o colágeno tipo 1 (*Col1a1*) pelos osteoblastos em cultura ($n=8$). Significância estatística foi comparada entre grupos. (* = $p < 0,05$), (** = $p < 0,005$).



5.6 Ti modificado com laser estimula a formação e mineralização de matriz extracelular

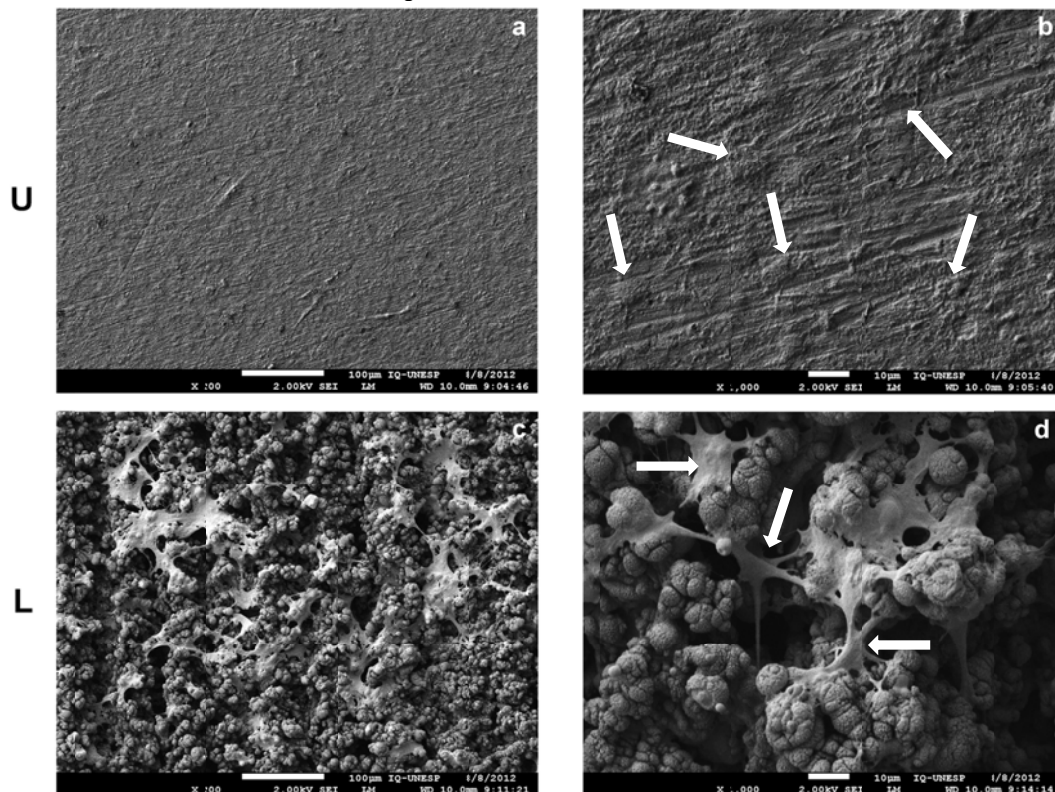
Após 24 horas em contato com as duas superfícies (U e L), foi possível observar um maior número de células presente sobre a superfície de Ti usinada quando comparado com a superfície tratada com laser. A morfologia dos osteoblastos aderidos na superfície U era fusiforme e plana (Figura 13a), apresentando alguns prolongamentos citoplasmáticos que pareciam aderir estas células ao substrato sobre o qual foram cultivadas. Foi observado também, que alguns osteoblastos exibiam formato poligonal (Figura 13b). As células cultivadas sobre a superfície de Ti irradiadas com laser apresentavam um formato tridimensional, caracterizando uma forte adesão local (Figura 13c). Foi detectado ainda, a presença de curtos prolongamentos citoplasmáticos originados do corpo celular (Figuras 13d).

Figura 13 - Fotomicrografias das superfícies U e L depois de 24 horas de realizada a cultura de osteoblastos. a) Observe as células fusiformes aderidas ao substrato U (setas). MEV, aumento original x 200. b) Num maior aumento, foi possível observar que osteoblastos (setas) estavam aderidos sobre a superfície usinada, a qual apresentava ranhuras decorrentes do processamento do disco de Ti. MEV, aumento original x 1000. c) A superfície irregular do disco irradiado com laser apresenta algumas poucas células evidentes, as quais se confundem com a própria estrutura globular do Ti. MEV, aumento original x 200. d) Detalhe da superfície de Ti irradiado, onde pode-se observar esferas e protrusões de diâmetros diferentes entre as quais há presença de poucos osteoblastos com curtos prolongamentos citoplasmáticos (seta) que aderiam estas células ao substrato. MEV, aumento original x 1.000.



Após três dias de contato dos osteoblastos com os substratos de Ti usinado (U), não se observou mudanças visíveis na morfologia celular, sendo possível apenas detectar um pequeno aumento no número de células, as quais estavam próximas da confluência (Figura 14a,b). Em contrapartida, os osteoblastos presentes sobre a superfície de Ti irradiada com laser (L), mostraram um formato estrelado com múltiplas adesões focais em relação às esferas características da superfície (Figura 14c). Entre as células, foi observado a presença de matriz de fibras amorfas (Figura 14d).

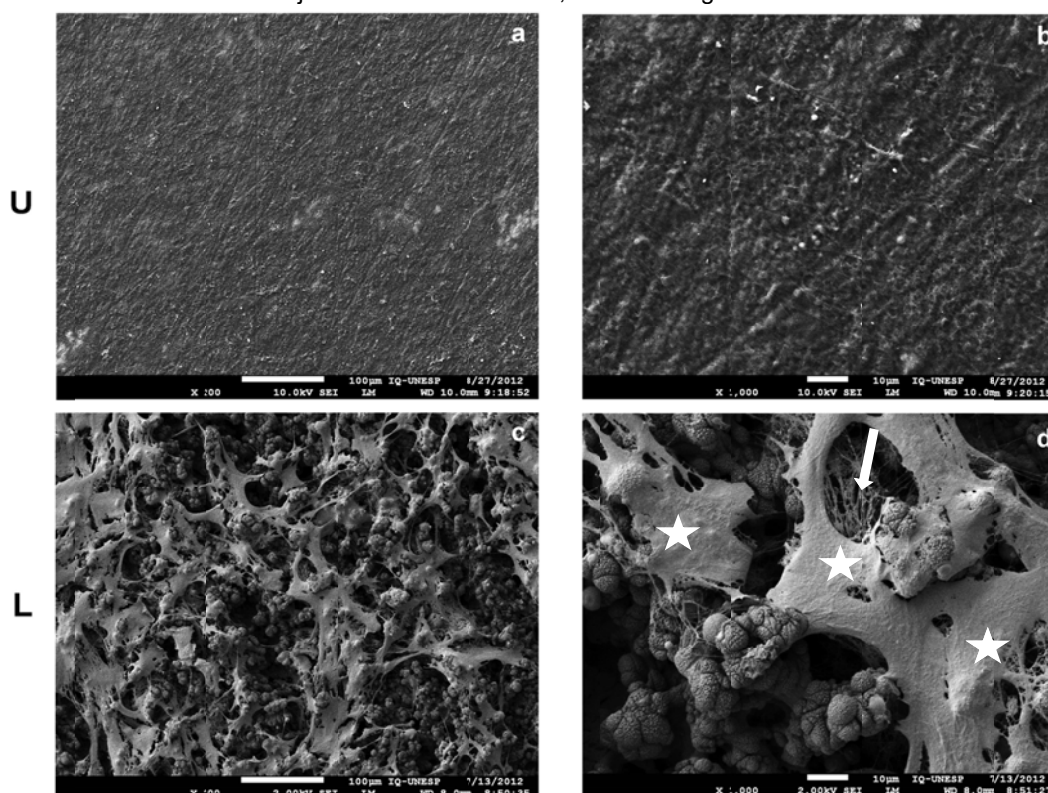
Figura 14 - Fotomicrografias das superfícies U e L após 3 dias do cultivo celular. a) Note a homogeneidade da cultura celular sobre o disco de Ti usinado. MEV, aumento original x 200. b) Detalhe da figura anterior, onde pode ser observado o grande número de células recobrindo, quase que totalmente, o substrato sobre o qual foram cultivadas. MEV, aumento original x 1.000. c) Observe a distribuição de um menor número de células de diferente morfologia sobre o disco de Ti irradiado. MEV, aumento original x 200. d) Detalhe da figura anterior, onde osteoblastos de morfologia estrelada (setas horizontais) se aderem, através de curtos processos citoplasmáticos, nas esferas de Ti. MEV, aumento original x 1.000.



Após 7 dias de cultura dos osteoblastos sobre a superfície de Ti usinada (Figuras 15a,b), as células se apresentavam confluentes, recobrindo todo substrato. Quando cultivadas sobre a o disco de Ti irradiado, um maior número de osteoblastos com morfologia variada, a qual parecia ser definida pela adesão de

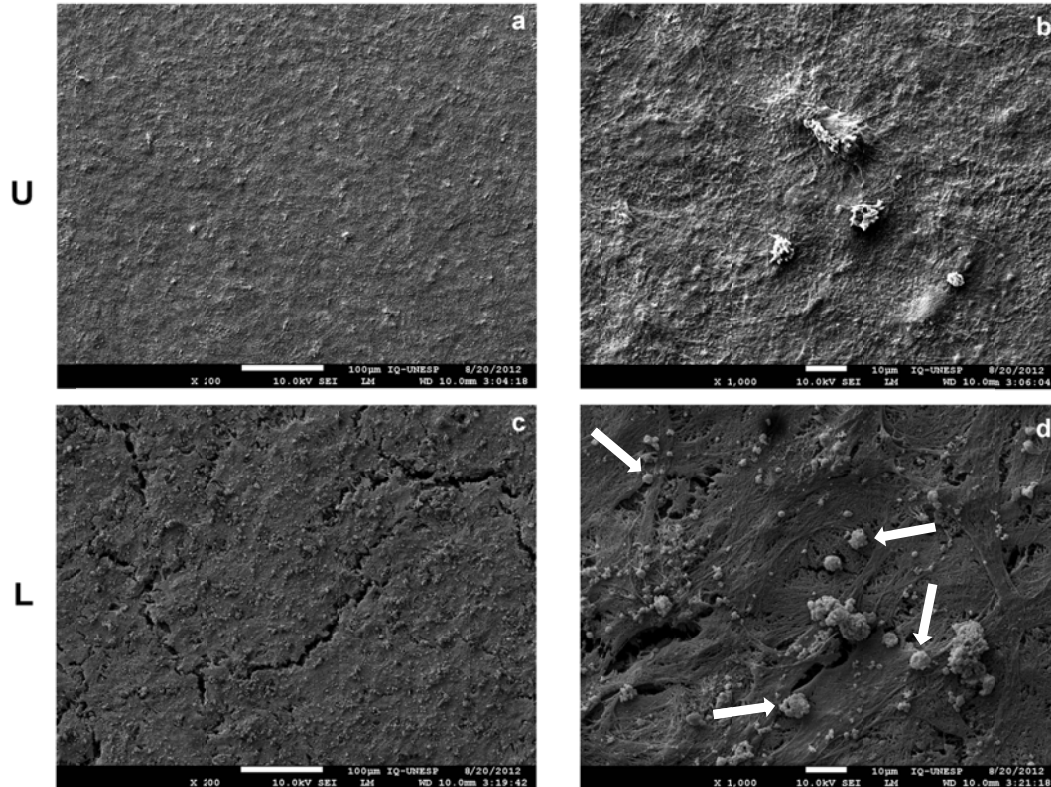
seus prolongamentos citoplasmáticos originados de seu corpo nas esferas do metal (Figura 15c,d). Uma maior área de matriz fibrosa foi evidenciada entre as células.

Figura 15 - Fotomicrografias das superfícies U e L após 7 dias de cultivo celular. a) Menor aumento da superfície de Ti recoberta por homogeneamente por células. MEV, aumento original x 200. B) Detalhe da figura anterior, onde a superfície do Ti, com grande número de células, exibe algumas ranhuras. MEV, aumento original x 1.000. c) Visão geral da superfície irradiada do Ti, onde pode-se observar numerosas células sobre o substrato altamente irregular. MEV, aumento original x 200. d) Detalhe da figura anterior, onde osteoblastos com amplo citoplasma (estrelas) se aderem ao grande número de esferas do substrato. Note que estrutura fibrosa, típica de matriz colagenosa (seta), pode ser claramente detectada adjacente às células. MEV, aumento original x 1.000.



No período mais longo (14 dias) de cultivo das células sobre os discos de Ti usinado e irradiado com laser, todo substrato havia sido recoberto por células associadas ou não à deposição de matriz fibrosa. Para os discos de Ti usinados, um grande número de células com morfologia plana recobriam o substrato (Figura 16a,b). Sobre a superfície de Ti irradiado, havia a deposição de uma camada de matriz fibrosa densa em meio a osteoblastos de variada morfologia. Sobre esta ampla estrutura rica em fibras, foi detectada a presença de glóbulos de diferentes tamanhos, os quais são sugestivos de cálcio que participam do processo de mineralização da matriz recém depositada (Figura 16c, d).

Figura 16 - Fotomicrografias das superfícies U e L após 14 dias do cultivo celular. a) Células recobrem completamente o substrato de Ti usinado. MEV, aumento original x 200. b) Detalhe da figura anterior, onde a proliferação celular e o amplo citoplasma das células planas resultou na perda de definição de cada uma delas, caracterizando a total confluência. MEV, aumento original x 1.000. c) Visão geral da camada de células e matriz fibrosa recobrindo a superfície irregular do disco de Ti irradiado. MEV, aumento original x 200. d) Detalhe das matriz extracelular rica em fibras típicas de colágeno em meio a osteoblastos de morfologia variada. Note os glóbulos de diferentes tamanhos (setas) sobre a matriz. MEV, aumento original x 1.000.



6 DISCUSSÃO

Modificações físico-químicas e topografias realizadas na estrutura do Ti têm sido utilizadas para influenciar positivamente a osseointegração. Os métodos mais comumente usados promovem a adesão ou subtração de materiais da superfície de Ti, através do uso de partículas ou agentes químicos, os quais podem atuar como possíveis contaminantes e invariavelmente elevam o custo final dos dispositivos para implante. Neste estudo, foram criadas micro e nano topografias em discos de Ti através da irradiação com o laser pulsado de Yb:YAG. Foi demonstrado que a modificação da superfície de titânio induzida pela irradiação com laser de alta potência elevou a rugosidade média (Ra) de $0,3151 \pm 0,006 \mu\text{m}$ na superfície U, para $10,57 \pm 0,39 \mu\text{m}$ na superfície L. Este valor de rugosidade é bem superior aos valores encontrados para outras superfícies modificadas por distintos métodos¹²³.

Para testar a hipótese de que a superfície de Ti criada pela irradiação com laser seria capaz de influenciar a diferenciação e maturação de osteoblastos, foram utilizadas, neste estudo, células isoladas de ossos de calvária de camundongos neonatos. Utilizando um método de digestão enzimática sequencial, conseguimos obter uma população de células enriquecida com pré-osteoblastos e osteoblastos, caracterizados pela capacidade de formar nódulos de mineralização *in vitro*, e de expressar a atividade de fosfatase alcalina¹³. Mesmo sendo caracterizada por uma população celular mista, esta apresenta progenitores de osteoblastos em diferentes estágios de diferenciação⁴⁰. Estudos prévios, *in vitro*, utilizaram diferentes tipos celulares para realizar experimentos de cultura de células sobre distintas superfícies de implantes¹²³. Porém, independentemente do método e célula utilizada, os resultados mostram uma correlação entre a rugosidade da superfície do Ti e a diferenciação e/ou a mineralização local. Na presente pesquisa, as células obtidas da calvária de camundongos, quando semeadas sobre as superfícies de Ti usinadas (U) e irradiadas com laser (L), foram capazes de formar nódulos de mineralização. A formação destes nódulos foi significativamente maior na superfície L no período de 14 dias (Figura 6).

Elias et al.³³ (2008) demonstraram que existe correlação direta entre a topografia e a integração dos implantes de Ti com o tecido ósseo, particularmente

quando foram comparados diferentes tipos de implantes com superfícies modificadas através de distintos métodos (condicionamento ácido, anodização e jateamento abrasivo). Os autores analisaram o torque de remoção após doze semanas da realização dos procedimentos cirúrgicos e demonstraram que a osseointegração variou de acordo com a rugosidade superficial dos implantes. No ano de 2012, Khang et al.⁵⁸ relataram que superfícies de escala nanométrica e de escala híbrida (nano-submicrométrica) induzem a rápida reorganização do citoesqueleto de células mesênquimais indiferenciadas cultivadas sobre as mesmas. Porém, apenas a superfície híbrida conseguiu acelerar a diferenciação celular após duas semanas. Desta maneira, os dados mostraram claramente a importância de contar com topografias híbridas com nano- e micro-escala para promover diferenciação precoce de osteoblastos e acelerar a osseointegração. No presente estudo, o uso de um perfilômetro óptico a laser e a avaliação dos espécimes em MEV, permitiram constatar que a superfície de Ti criada pela irradiação com laser apresentavam nano, sub-micro e micro topografias, as quais podem ter sido as principais responsáveis por acelerar os processos de diferenciação e maturação celular. Recentemente, Svanborg et al.¹⁰⁷ (2010) caracterizaram doze diferentes superfícies de implantes dentais comercialmente disponíveis, usando para isto as técnicas de MEV e perfilometria óptica, as quais permitiram identificar desde estruturas na escala nanométrica até micrométrica. Na presente pesquisa, os valores de rugosidade média ($R_a = 10,57 \pm 0,39 \mu\text{m}$, $n=9$), determinados através do uso de perfilômetro óptico, demonstraram que é possível obter alta rugosidade mediante através da irradiação do Ti com laser de alta potência, sendo que a técnica empregada apresentou alto grau de reprodutibilidade.

A detalhada análise da morfologia celular é particularmente importante para a área da implantodontia, pois tem sido demonstrado que a conformação do citoesqueleto celular está relacionada diretamente com a expressão de fatores de proliferação e diferenciação osteoblástica⁵⁸. No ano de 2010, Uggeri et al.¹¹² demonstraram, por meio da marcação do citoesqueleto celular, que células cultivadas sobre Ti sem tratamento (liso) apresentavam morfologia alongada. Por outro lado, as células cultivadas sobre a superfície de Ti modificada (SLA) exibiam morfologia poligonal. Estes dados foram corroborados pelo presente estudo, onde a maioria dos osteoblastos sobre o Ti irradiado com laser apresentavam morfologia

poligonal/estrelado, sendo que àqueles observados sobre o Ti usinado eram fusiformes (Figura 16b, d). No presente estudo, foi possível observar relação entre morfologia celular e um mais rápido processo de diferenciação de osteoblastos e formação precoce de matriz extracelular. Estes achados são particularmente interessantes para o estudo da osseointegração, visto que em estudos prévios demonstraram que superfícies de Ti com nano-desordens, como aquelas observadas nesta pesquisa (L), oferecem um substrato mais adequado para adesão e diferenciação de células mesenquimais humanas, mesmo quando não são estimuladas com fatores osteogênicos.

Para testar a mineralização nas duas superfícies de Ti avaliadas neste estudo, foi realizada quantificação colorimétrica dos nódulos de calcificação formados após 7 e 14 dias de cultura. O protocolo utilizado foi o ensaio de vermelho de alizarina, por ser esta uma metodologia amplamente empregada para quantificar a presença de depósitos de cálcio formados por células de linhagem osteogênica¹⁷. Na presente pesquisa, as células semeadas sobre a superfície de Ti irradiada com laser (L) foram capazes de produzir maior quantidade de material mineralizado quando comparado com as células cultivadas sobre o Ti usinado (U) (Figura 6). Nossos resultados corroboram com dados científicos obtidos em estudos prévios realizados com outras células (MC3T3-E1²¹, tronco mesenquimais humanas⁷³, mesenquimais palatais humanas⁷⁶ e osteoblastos humanos¹²⁰). Nestes estudos, os autores demonstraram que a quantidade de formação de nódulos de mineralização estava diretamente relacionada com a rugosidade de superfície do Ti. Associado ao ensaio de vermelho de alizarina, a medição da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALPase) tem sido amplamente usada como indicador do fenótipo osteogênico das células em cultura¹⁷. Na presente pesquisa, tanto no período de 7 como no de 14 dias, a atividade desta enzima se elevou quando as células foram cultivadas sobre a superfície L. Estudos prévios mostraram que independente da linhagem celular semeada sobre o Ti, a atividade de ALPase se mostra aumentada quando as células se aderem a superfícies rugosas^{51, 60, 66, 96}.

No presente estudo, o ensaio de MTT foi realizado para descartar a possibilidade de que a maior atividade mineralizadora detectada sobre a superfície de Ti irradiada com laser pudesse ser decorrente do aumento no número de células viáveis. Este ensaio colorimétrico, o qual determina a viabilidade celular, tem sido

amplamente usado para medir a atividade de enzimas celulares que são capazes de reduzir o corante de *tetrazolium* em cristais de *formazan*¹¹. Com relação à viabilidade celular, foi possível observar que não houve diferença quando as células foram cultivadas sobre as superfícies (U e L) dos discos de Ti e analisadas nos períodos de 1 e 3 dias. Porém, aos 7 dias esta atividade celular foi maior sobre a superfície de Ti usinada, resultado este que corrobora com achados laboratoriais prévios em que os pesquisadores demonstraram que superfícies rugosas reduzem a proliferação de células cultivadas sobre as mesmas⁵. Há quase uma década, Washburn et al.¹²² (2004) relataram que superfícies rugosas (0,5-13 nm) diminuem, significativamente, a proliferação de osteoblastos. Uma possível hipótese para isto é que a estrutura irregular apresentada pelos substratos rugosos, limita a área lateral disponível para a proliferação das células, bem como dificulta as trocas metabólicas e o contato célula-a-célula. Ainda, as rugosidades da superfície de Ti podem induzir, mediada pela proteína rhBMP-2, diferenciação osteogênica precoce in vitro, onde as células mais diferenciadas passam a se dividir de maneira mais lenta⁵⁵. Esta rápida diferenciação de osteoblastos foi confirmada por Chiesa et al.¹⁹ (2007), os quais cultivaram células sobre uma rede de filamentos de Ti com dimensões nanométricas.

Com o objetivo de confirmar se a superfície de Ti irradiada com laser (L) é capaz de induzir a diferenciação de células com fenótipo osteoblástico, foi analisado, neste estudo, a expressão de mRNA que codifica para dois fatores de transcrição (*Runx2* e *SP7*). Também foi avaliado o maior constituinte orgânico da matriz óssea (*Col1a1*), o gene que codifica a enzima fosfatase alcalina (*Alp*) e o gene da proteína não colágena mais abundante da matriz extracelular, a qual aparece nos processos de formação de tecido mineralizado (*Spp1*). A seleção dos genes para análise na presente pesquisa foi baseada em estudos prévios^{69, 75}.

A expressão de *Runx2* é essencial para a diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos, sendo que num estado de transformação mais avançado, estas células passam também a expressar *Sp7*⁶⁹. Em superfícies irregulares de Ti criadas pelo método de jateamento (TiO₂) ou pela combinação de jateamento e condicionamento (TiO₂ e ácido hidrófluorídrico), as células MC3T3-E1 semeadas pelo período de 1 a 14 dias passaram a expressar maior nível dos genes *Runx2* e *Sp7*⁴², sendo que dados semelhantes foram obtidos na presente pesquisa

onde pré-osteoblastos obtidos de calvária de camundongos foram cultivadas sobre Ti que apresentam rugosidades decorrentes da irradiação com laser de alta potência. Num estudo recente, Khan et al.⁵⁷ (2012) demonstraram que o pico de expressão do gene *Runx2* aconteceu 24 horas após as células terem sido cultivadas, sendo que esta atividade celular específica reduziu com o decorrer dos períodos. Estes dados confirmam a ocorrência de diferenciação celular precoce¹³⁰, sendo que a maturação celular dentro do fenótipo de osteoblastos resulta na queda da expressão de *Runx2*. Por outro lado, a análise de *Sp7* revelou que o pico de expressão deste gene aconteceu 3 dias após o cultivo celular. Este fato demonstra, de maneira clara, o comportamento comum de pré-osteoblastos em fase de transformação para osteoblastos imaturos⁶¹.

Tem sido demonstrado que a síntese e expressão de *Alpl* e *Spp1*, bem como a produção de colágeno tipo I (Col-I) aumentam na presença do fator de transcrição *Runx2*¹³⁰. O gene *Col1a1* codifica a cadeia $\alpha 1$ do Col-1, a qual representa o componente mais abundante da matriz óssea⁴⁹. Na presente pesquisa, observou-se que a expressão de *Col1a1* foi estimulada quando as células foram cultivadas sobre superfícies de discos de Ti irradiadas com laser (L). Estudos prévios mostraram variações na expressão deste gene quando células foram cultivadas sobre superfícies usinadas e rugosas^{58, 60}. Takashi et al.¹⁰⁹ relataram a ocorrência de aumento na transcrição do Col-I antes que ocorresse o processo de mineralização da matriz pelos osteoblastos. Recentemente, Mendonça et al.⁷³ (2011) mostraram que a expressão de *Col1a1* é positivamente regulada por superfícies rugosas, as quais elevam a biossíntese de colágeno por células mesenquimais humanas. Confirmando o aumento observado na atividade da ALPase, foi demonstrado, na presente pesquisa, que o mRNA do gene *Alpl* foi também regulado positivamente nos períodos de 1 e 7 dias pós- cultivo dos pré-osteoblastos sobre o Ti irradiado, sendo que este dado corrobora com estudos prévios realizados com células MC3T3-E1⁴². A osteopontina, codificada pelo gene *Spp1*, está intimamente associada com o controle da mineralização da matriz extracelular¹⁰². No presente estudo, foi observado aumento na expressão desta proteína desde 1 até 14 dias após o cultivo celular sobre os discos de Ti irradiados com laser. Este resultado está em concordância com estudos prévios, onde os autores demonstraram que superfícies de Ti que apresentam escala nanométrica sobre-regulam, no período de

1 a 3 dias, a produção de osteopontina por células obtidas da calvária de camundongos ¹⁵.

O presente estudo apresentou limitações como a dificuldade para distinguir as células semeadas sobre a superfície U durante o análise sob MEV. Embora os valores bidimensionais de rugosidade apresentados permitam uma comparação entre os grupos estudados, mediante a descrição de valores tridimensionais seria possível ter uma melhor caracterização mesma que facilitaria a comparação com recentes estudos.

Condições ósseas de baixa qualidade e defeitos ósseos ao redor da zona receptora do implante exigem melhora e estimulação na osteogênese para que se possa obter um nível de contato osso-implante adequado, de tal maneira que o implante possa suportar a prótese. Uma forma eficaz de cumprir esse requisito é modificar a superfície do implante pela irradiação do Ti com laser pulsado de alta potência, tal como demonstrado neste estudo. O uso deste tipo de laser de alta potência para alterar as propriedades estruturais dos implantes osseointegráveis é um método de tratamento superficial de Ti promissor. Isto porque além dos relevantes dados biológicos fornecidos por interessantes artigos científicos e também por este estudo laboratorial, este método apresenta aplicação clínica viável, pois é simples, reproduzível, de baixo custo e que elimina o uso de associações com outros processamentos de superfície. Desta maneira, futuros estudos in vitro e in vivo devem ser realizados, de tal maneira que os conhecimentos científicos possam ser direcionados para o desenvolvimento de técnicas de reposição de dentes perdidos, através do uso de implantes intraósseos seguros e acessíveis para toda população.

REFERENCIAS*

1. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 2002; 16(21): 2813-28.
2. Akiyama H, Kim JE, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, et al. Osteochondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(41): 14665-70.
3. 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.
4. Ann Arbor Conference on Optical Pumping UoM, Franken PA, Sands RH, editors. The Ann Arbor conference on optical pumping, the University of Michigan, June 15 through June 18, 1959 1959; Ann Arbor: [s.n.
5. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000; 21(7): 667-81.
6. Arys A, Philippart C, Dourov N, He Y, Le QT, Pireaux JJ. Analysis of titanium dental implants after failure of osseointegration: combined histological, electron microscopy, and X-ray photoelectron spectroscopy approach. *J Biomed Mater Res.* 1998; 43(3): 300-12.
7. Att W, Tsukimura N, Suzuki T, Ogawa T. Effect of supramicron roughness characteristics produced by 1- and 2-step acid etching on the osseointegration capability of titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007; 22(5): 719-28.
8. Baht GS, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. *Matrix Biol.* 2008; 27(7): 600-8.
9. Balasundaram G, Webster TJ. Nanotechnology and biomaterials for orthopedic medical applications. *Nanomedicine (Lond).* 2006; 1(2): 169-76.
10. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2006; 2(12): e216.
11. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005; 11: 127-52.
12. Bonsignore LA, Colbrunn RW, Tatro JM, Messerschmitt PJ, Hernandez CJ, Goldberg VM, et al. Surface contaminants inhibit osseointegration in a novel murine model. *Bone.* 2011; 49(5): 923-30.
13. Boonekamp PM HJ, Hamilton JW, Cohn D, Jilka RL. Effects of culture on the hormone responsiveness of bone cells isolated by improved sequential digestion procedure. *Proc K Ned Akad Wet.* 1984; 87: 371-82.
14. Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, Bjursten LM, van der Heyde H, Jin S. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO(2) nanotube surface. *Acta Biomater.* 2009; 5(8): 3215-23.

* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

15. Bueno Rde B, Adachi P, Castro-Raucci LM, Rosa AL, Nanci A, Oliveira PT. Oxidative nanopatterning of titanium surfaces promotes production and extracellular accumulation of osteopontin. *Braz Dent J*. 2011; 22(3): 179-84.
16. Butz F, Aita H, Wang CJ, Ogawa T. Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. *J Dent Res*. 2006; 85(6): 560-5.
17. 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.
18. Chenglong L, Dazhi Y, Guoqiang L, Min Q. Corrosion resistance and hemocompatibility of multilayered Ti/TiN-coated surgical AISI 316L stainless steel. *Materials Letters*. 2005; 59(29-30): 3813-9.
19. Chiesa R, Giavaresi G, Fini M, Sandrini E, Giordano C, Bianchi A, et al. In vitro and in vivo performance of a novel surface treatment to enhance osseointegration of endosseous implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 103(6): 745-56.
20. Cho SA, Park KT. The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. *Biomaterials*. 2003; 24(20): 3611-7.
21. 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.
22. Choi JW, Heo SJ, Koak JY, Kim SK, Lim YJ, Kim SH, et al. Biological responses of anodized titanium implants under different current voltages. *J Oral Rehabil*. 2006; 33(12): 889-97.
23. Dahotre NB, Paital SR, Samant AN, Daniel C. Wetting behaviour of laser synthetic surface microtextures on Ti-6Al-4V for bioapplication. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 2010; 368(1917): 1863-89.
24. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. 1998; 11(5): 391-401.
25. De Giglio E, Cometa S, Calvano CD, Sabbatini L, Zambonin PG, Colucci S, et al. A new titanium biofunctionalized interface based on poly(pyrrole-3-acetic acid) coating: proliferation of osteoblast-like cells and future perspectives. *J Mater Sci Mater Med*. 2007; 18(9): 1781-9.
26. De Giglio E, Cometa S, Cioffi N, Torsi L, Sabbatini L. Analytical investigations of poly(acrylic acid) coatings electrodeposited on titanium-based implants: a versatile approach to biocompatibility enhancement. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 389(7-8): 2055-63.
27. Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*. 2002; 143(4): 1545-53.
28. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 2000; 289(5484): 1501-4.
29. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*. 1999; 13(8): 1025-36.

30. Duyck J, Slaets E, Sasaguri K, Vandamme K, Naert I. Effect of intermittent loading and surface roughness on peri-implant bone formation in a bone chamber model. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(11): 998-1006.
31. Ekelund JA, Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. Implant treatment in the edentulous mandible: a prospective study on Branemark system implants over more than 20 years. *Int J Prosthodont.* 2003; 16(6): 602-8.
32. Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature.* 2005; 434(7032): 514-20.
33. Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, 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.
34. Forsgren J, Paz MD, Leon B, Engqvist H. Laser induced surface structuring and ion conversion in the surface oxide of titanium: possible implications for the wettability of laser treated implants. *J Mater Sci Mater Med.* 2013; 24(1): 11-5.
35. Giavaresi G, Fini M, Cigada A, Chiesa R, Rondelli G, Rimondini L, et al. Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone. *Biomaterials.* 2003; 24(9): 1583-94.
36. Giavaresi G, Fini M, Chiesa R, Rimondini L, Rondelli G, Borsari V, et al. Osseointegration of sandblasted or anodised hydrothermally-treated titanium implants: mechanical, histomorphometric and bone hardness measurements. *Int J Artif Organs.* 2002; 25(8): 806-13.
37. Goene RJ, Testori T, Trisi P. Influence of a nanometer-scale surface enhancement on de novo bone formation on titanium implants: a histomorphometric study in human maxillae. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2007; 27(3): 211-9.
38. Golub EE. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790(12): 1592-8.
39. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2000; 2(3): 120-8.
40. Granholm S, Henning P, Lindholm C, Lerner UH. Osteoclast progenitor cells present in significant amounts in mouse calvarial osteoblast isolations and osteoclastogenesis increased by BMP-2. *Bone.* 2013; 52(1): 83-92.
41. Grassi S, Piattelli A, de Figueiredo LC, Feres M, de Melo L, Iezzi G, et al. Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces. *J Periodontol.* 2006; 77(10): 1736-43.
42. Guo J, Padilla RJ, Ambrose W, De Kok IJ, Cooper LF. The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO₂ grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. *Biomaterials.* 2007; 28(36): 5418-25.
43. György E, Pérez del Pino A, Serra P, Morenza JL. Chemical composition of dome-shaped structures grown on titanium by multi-pulse Nd:YAG laser irradiation. *Appl Surf Sci.* 2004; 222(1-4): 415-22.

44. György E, Pérez del Pino A, Serra P, Morenza JL. Surface nitridation of titanium by pulsed Nd:YAG laser irradiation. *Appl Surf Sci.* 2002; 186(1–4): 130-4.
45. Hall BK. *Bone and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology.* San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
46. Helary G, Noirclere F, Mayingi J, Migonney V. A new approach to graft bioactive polymer on titanium implants: Improvement of MG 63 cell differentiation onto this coating. *Acta Biomater.* 2009; 5(1): 124-33.
47. Hilton MJ, Tu X, Wu X, Bai S, Zhao H, Kobayashi T, et al. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med.* 2008; 14(3): 306-14.
48. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell.* 2005; 8(5): 727-38.
49. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* 2004; 362(1825): 2821-50.
50. Hirao M, Sugamoto K, Tamai N, Oka K, Yoshikawa H, Mori Y, et al. Macro-structural effect of metal surfaces treated using computer-assisted yttrium-aluminum-garnet laser scanning on bone-implant fixation. *J Biomed Mater Res A.* 2005; 73(2): 213-22.
51. Hott M, Noel B, Bernache-Assolant D, Rey C, Marie PJ. Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res.* 1997; 37(4): 508-16.
52. Hsu SH, Liu BS, Lin WH, Chiang HC, Huang SC, Cheng SS. Characterization and biocompatibility of a titanium dental implant with a laser irradiated and dual-acid etched surface. *Biomed Mater Eng.* 2007; 17(1): 53-68.
53. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(18): 8562-5.
54. Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12(2): 128-34.
55. Jiang QH, Liu L, Shen JW, Peel S, Yang GL, Zhao SF, et al. Influence of multilayer rhBMP-2 DNA coating on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells seeded on roughed titanium surface. *J Biomed Mater Res A.* 2012; 100 A(10): 2766-74.
56. Kato T, Kusakari H, Hoshino E. Bactericidal efficacy of carbon dioxide laser against bacteria-contaminated titanium implant and subsequent cellular adhesion to irradiated area. *Lasers Surg Med.* 1998; 23(5): 299-309.
57. Khan MR, Donos N, Salih V, Brett PM. The enhanced modulation of key bone matrix components by modified Titanium implant surfaces. *Bone.* 2012; 50(1): 1-8.
58. Khang D, Choi J, Im YM, Kim YJ, Jang JH, Kang SS, et al. Role of subnano-, nano- and submicron-surface features on osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2012; 33(26): 5997-6007.

59. Khang W, Feldman S, Hawley CE, Gunsolley J. A multi-center study comparing dual acid-etched and machined-surfaced implants in various bone qualities. *J Periodontol.* 2001; 72(10): 1384-90.
60. 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.
61. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006; 99(5): 1233-9.
62. Komori T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem.* 2005; 95(3): 445-53.
63. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997; 89(5): 755-64.
64. Krischak GD, Gebhard F, Mohr W, Krivan V, Ignatius A, Beck A, et al. Difference in metallic wear distribution released from commercially pure titanium compared with stainless steel plates. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2004; 124(2): 104-13.
65. Lee BH, Kim JK, Kim YD, Choi K, Lee KH. In vivo behavior and mechanical stability of surface-modified titanium implants by plasma spray coating and chemical treatments. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 69(2): 279-85.
66. Li LH, Kong YM, Kim HW, Kim YW, Kim HE, Heo SJ, et al. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials.* 2004; 25(14): 2867-75.
67. Li Y, Lee IS, Cui FZ, Choi SH. The biocompatibility of nanostructured calcium phosphate coated on micro-arc oxidized titanium. *Biomaterials.* 2008; 29(13): 2025-32.
68. Liang CH, Shimizu Y, Sasaki T, Koshizaki N. Preparation of ultrafine TiO₂ nanocrystals via pulsed-laser ablation of titanium metal in surfactant solution. *Appl. Phys. A.* 2005; 80(4): 819-22.
69. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13(1): 27-38.
70. Mante FK, Little K, Mante MO, Rawle C, Baran GR. Oxidation of titanium, RGD peptide attachment, and matrix mineralization rat bone marrow stromal cells. *J Oral Implantol.* 2004; 30(6): 343-9.
71. Meirelles L, Currie F, Jacobsson M, Albrektsson T, Wennerberg A. The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008; 23(4): 641-7.
72. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials.* 2007; 28(32): 4748-55.
73. Mendonça DBS, Miguez PA, Mendonça G, Yamauchi M, Aragão FJL, Cooper LF. Titanium surface topography affects collagen biosynthesis of adherent cells. *Bone.* 2011; 49(3): 463-72.
74. Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials.* 2008; 29(28): 3822-35.

75. Mendonça G, Mendonça DBS, Simões LGP, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, et al. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials*. 2009; 30(25): 4053-62.
76. Mozumder MS, Zhu J, Perinpanayagam H. Titania-polymeric powder coatings with nanotopography support enhanced human mesenchymal cell responses. *J Biomed Mater Res A*. 2012; 100(10): 2695-709.
77. Muller FA, Bottino MC, Muller L, Henriques VA, Lohbauer U, Bressiani AH, et al. In vitro apatite formation on chemically treated (P/M) Ti-13Nb-13Zr. *Dent Mater*. 2008; 24(1): 50-6.
78. Müller M, Hennig FF, Hothorn T, Stangl R. Bone-implant interface shear modulus and ultimate stress in a transcortical rabbit model of open-pore Ti6Al4V implants. *J Biomech*. 2006; 39(11): 2123-32.
79. Muller R, Abke J, Schnell E, Scharnweber D, Kujat R, Englert C, et al. Influence of surface pretreatment of titanium- and cobalt-based biomaterials on covalent immobilization of fibrillar collagen. *Biomaterials*. 2006; 27(22): 4059-68.
80. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002; 108(1): 17-29.
81. Oh SH, Finones RR, Daraio C, Chen LH, Jin S. Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials*. 2005; 26(24): 4938-43.
82. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000; 16: 191-220.
83. Owen M. Cell population kinetics of an osteogenic tissue. I. *J Cell Biol*. 1963; 19: 19-32.
84. Owen M, Macpherson S. Cell population kinetics of an osteogenic Tissue. II. *J Cell Biol*. 1963; 19: 33-44.
85. Palmquist A, Lindberg F, Emanuelsson L, Branemark R, Engqvist H, Thomsen P. Biomechanical, histological, and ultrastructural analyses of laser micro- and nano-structured titanium alloy implants: a study in rabbit. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 92(4): 1476-86.
86. Piattelli A, Manzon L, Scarano A, Paolantonio M, Piattelli M. Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13(6): 805-10.
87. Picraux ST, Pope LE. Tailored surface modification by ion implantation and laser treatment. *Science*. 1984; 226(4675): 615-22.
88. Pritchard JJ. A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat. *J Anat*. 1952; 86(3): 259-77.
89. Raikar GN, Gregory JC, Ong JL, Lucas LC, Lemons JE, Kawahara D, et al. Surface characterization of titanium implants. *J Vac Sci Technol A*. 1995; 13(5): 2633-7.
90. Ramis JM, Taxt-Lamolle SF, Lyngstadaas SP, Reseland JE, Ellingsen JE, Monjo M. Identification of early response genes to roughness and fluoride modification of titanium implants in human osteoblasts. *Implant Dent*. 2012; 21(2): 141-9.

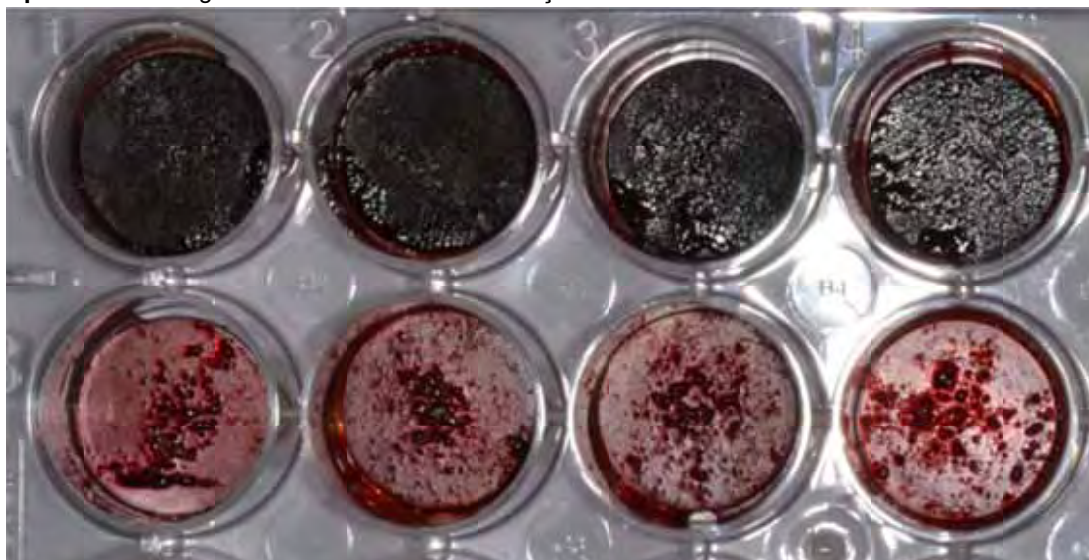
91. Roach P, Farrar D, Perry CC. Surface tailoring for controlled protein adsorption: effect of topography at the nanometer scale and chemistry. *J Am Chem Soc.* 2006; 128(12): 3939-45.
92. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.* 2008; 283(9): 5866-75.
93. Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development.* 2006; 133(16): 3231-44.
94. Sammons RL, Lumbikanonda N, Gross M, Cantzler P. Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration. A scanning electron microscopic study. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16(6): 657-66.
95. Saruwatari L, Aita H, Butz F, Nakamura HK, Ouyang J, Yang Y, et al. Osteoblasts generate harder, stiffer, and more delamination-resistant mineralized tissue on titanium than on polystyrene, associated with distinct tissue micro- and ultrastructure. *J Bone Miner Res.* 2005; 20(11): 2002-16.
96. Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res.* 1999; 13: 38-48.
97. 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.
98. Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen JA, Creugers NH. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *J Dent Res.* 2006; 85(6): 496-500.
99. Shi Z, Neoh KG, Kang ET, Poh C, Wang W. Bacterial adhesion and osteoblast function on titanium with surface-grafted chitosan and immobilized RGD peptide. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 86(4): 865-72.
100. Sinjari B, Guarnieri S, Diomedede F, Merciaro I, Mariggio MA, Caputi S, et al. Influence of titanium laser surface geometry on proliferation and on morphological features of human mandibular primary osteoblasts. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012; 26(3): 505-13.
101. Soboyejo WO, Nemetski B, Allameh S, Marcantonio N, Mercer C, Ricci J. Interactions between MC3T3-E1 cells and textured Ti6Al4V surfaces. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62(1): 56-72.
102. Sodek KL, Tupy JH, Sodek J, Grynpas MD. Relationships between bone protein and mineral in developing porcine long bone and calvaria. *Bone.* 2000; 26(2): 189-98.
103. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 1999; 13(16): 2072-86.
104. 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.

105. Sullivan DY, Sherwood RL, Mai TN. Preliminary results of a multicenter study evaluating a chemically enhanced surface for machined commercially pure titanium implants. *J Prosthet Dent.* 1997; 78(4): 379-86.
106. Sun S, Wang Z, Hao Y. Osterix overexpression enhances osteoblast differentiation of muscle satellite cells in vitro. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 37(4): 350-6.
107. Svanborg LM, Andersson M, Wennerberg A. Surface characterization of commercial oral implants on the nanometer level. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 92(2): 462-9.
108. Szmukler-Moncler S, Perrin D, Ahossi V, Magnin G, Bernard JP. Biological properties of acid etched titanium implants: effect of sandblasting on bone anchorage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004; 68(2): 149-59.
109. 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.
110. Tang L, Eaton JW. Natural responses to unnatural materials: A molecular mechanism for foreign body reactions. *Mol Med.* 1999; 5(6): 351-8.
111. Tu X, Joeng KS, Nakayama KI, Nakayama K, Rajagopal J, Carroll TJ, et al. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation. *Dev Cell.* 2007; 12(1): 113-27.
112. 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.
113. Vajtai R, Beleznai C, Nánai L, Gingl Z, George TF. Nonlinear aspects of laser-driven oxidation of metals. *Appl Surf Sci.* 1996; 106(0): 247-57.
114. van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med.* 2004; 199(6): 805-14.
115. Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. Bone healing capacity of titanium plasma-sprayed and hydroxylapatite-coated oral implants. *Clin Oral Implants Res.* 1998; 9(4): 261-71.
116. Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. The effect of titanium plasma-sprayed implants on trabecular bone healing in the goat. *Biomaterials.* 1998; 19(11-12): 1093-9.
117. Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. Histomorphometrical and mechanical evaluation of titanium plasma-spray-coated implants placed in the cortical bone of goats. *J Biomed Mater Res.* 1998; 41(1): 41-8.
118. Waby JS, Bingle CD, Corfe BM. Post-translational control of sp-family transcription factors. *Curr Genomics.* 2008; 9(5): 301-11.
119. Wang X, Kua HY, Hu Y, Guo K, Zeng Q, Wu Q, et al. p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *J Cell Biol.* 2006; 172(1): 115-25.
120. Ward BC, Webster TJ. The effect of nanotopography on calcium and phosphorus deposition on metallic materials in vitro. *Biomaterials.* 2006; 27(16): 3064-74.

121. Warren P, Chaffee N, Felton DA, Cooper LF. A retrospective radiographic analysis of bone loss following placement of TiO₂ grit-blasted implants in the posterior maxilla and mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002; 17(3): 399-404.
122. Washburn NR, Yamada KM, Simon CG, Jr., Kennedy SB, Amis EJ. High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation. *Biomaterials*. 2004; 25(7-8): 1215-24.
123. 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.
124. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Sawase T, Lausmaa J. Surface characterization and biological evaluation of spark-eroded surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 1997; 8(12): 757-63.
125. Winslow MM, Pan M, Starbuck M, Gallo EM, Deng L, Karsenty G, et al. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell*. 2006;10(6):771-82.
126. Wolf-Brandstetter C, Lode A, Hanke T, Scharnweber D, Worch H. Influence of modified extracellular matrices on Ti6AL4V implants on binding and release of VEGF. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 79(4): 882-94.
127. Zeifang F, Grunze M, Delling G, Lorenz H, Heisel C, Tosounidis G, et al. Improved osseointegration of PTFEP-coated titanium implants. *Med Sci Monit*. 2008; 14(2): BR35-40.
128. Zhou X, Zhang Z, Feng JQ, Dusevich VM, Sinha K, Zhang H, et al. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(29): 12919-24.
129. Zhou YL, Niinomi M, Akahori T, Fukui H, Toda H. Corrosion resistance and biocompatibility of Ti-Ta alloys for biomedical applications. *Mater Sci Eng A*. 2005; 398(1-2): 28-36.
130. Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. Runx2: of bone and stretch. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(9): 1659-63.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Imagens dos nódulos de mineralização formados sobre os discos de Ti



ANEXO

Anexo 1 – Documento de aprovação da pesquisa pelo comitê de ética.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 17/2011

Araraquara, 03 de Abril de 2012

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 03/04/2012, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Adesão, proliferação e diferenciação de pré-osteoblastos cultivados sobre superfície de titânio irradiada ou não com laser de alta potência." (Proc. CEUA nº 17/2011) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para MARÇO/2013.

Atenciosamente.



Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Ao
Prof. Dr. CARLOS ALBERTO DE SOUZA COSTA
DD. Pesquisador Responsável
a/c Eduardo Mariscal Muñoz
Departamento de Fisiologia e Patologia

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 06 de Março de 2013

Eduardo Mariscal Muñoz