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

**LAIS MORANDINI CARVALHO**

# ANÁLISE *IN VIVO* DA MODULAÇÃO ÓSSEA EM IMPLANTES DE TITÂNIO COM SUPERFÍCIE EM NANOESCALA

2017

**LAIS MORANDINI CARVALHO**

# ANÁLISE *IN VIVO* DA MODULAÇÃO ÓSSEA EM IMPLANTES DE TITÂNIO COM SUPERFÍCIE EM NANOESCALA

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

Orientadora: Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Mendonça

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2017]. Disponível em http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao

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

Carvalho, Lais Morandini
Análise in vivo da modulação óssea em implantes de titânio com superfície em nanoescala / Lais Morandini Carvalho. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.
67 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.
Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos
Coorientador: Gustavo Mendonça

1. Titânio. 2. Nanoescala. 3. Osseointegração. 4. Implantes. I. Marotta Reis de Vasconcellos , Luana , orient. II. Mendonça, Gustavo, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Profa Leila Novaes - Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação (STATI) do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor
Ana Paula Mattozo Durante CRB8/6141

**BANCA EXAMINADORA**

**Professora Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos**
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

**Professora Dr. Daniela Baccelli Silveira Mendonça**
University of Michigan
School of Dentistry
Campus de Ann Arbor

**Professora Dra. Elisa Mattias Sartori**
Universidade Sagrado Coração
Faculdade de Odontologia
Campus de Fernandópolis

**Professora Titular Yasmin Rodarte Carvalho**
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

**Professora Dra. Renata Falchete do Prado**
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 20 de Novembro de 2017.

# DEDICATÓRIA

***A DEUS, que me concedeu saúde e sabedoria para realização deste projeto***

***Especialmente a minha mãe Claudia, por todo apoio, dedicação, confiança e ajuda. Por ser essa mulher incrível que me ensinou que nossos sonhos nascem no coração de DEUS e por isso nunca devemos desistir deles***

***Aos meus filhos Pedro e Davi por serem a inspiração para a minha vida.***

# AGRADECIMENTOS

***Ao meu marido Diego pelo apoio e confiança***

***Aos meus irmãos Thiago, Junior e Felipe e minhas cunhadas Helen, Carol e especialmente a Carol (esposa do Thiago), pelos 2 meses dedicados a mim e ao Pedro durante meu doutorado sanduíche***

***A minha avó Nazira por ter me sustentado em orações***

***As queridas amigas e parceiras de laboratório Elisa e Elis, por toda ajuda, companheirismo e conhecimento que me transmitiram e por terem sido minha família no período que estive em Ann Arbor***

***Aos queridos professores Gustavo e Daniela Mendonça, mestres e pessoas incríveis que me ensinaram com toda a paciência e cuidado durante o período de doutorado sanduíche em Ann Arbor. Serei sempre grata por terem aberto as portas para mim e para o Pedro e por ter tido essa excelente experiência com vocês***

***Aos queridos colegas do Krebsbach's Lab, Dr. Luis Villa, Joe, Tugba, Harleen, Connor, Jin Koo, Fatima, e em especial ao professor Paul Krebsbach por ter me recebido, pelo auxílio e conhecimento que me permitiram ter acesso***

***A professora Luana, minha orientadora, que confiou em mim e auxiliou no desenvolvimento deste projeto***

***Aos colegas de doutorado do ICT Unesp Victor, Noala, Milagros pelas boas risadas e aos colegas da UFRN Jana, Filipe e professora Silvia por gentilmente terem me recebido em sua universidade***

***Aos professores e técnicas do programa de pós graduação em Patologia, pela paciência e ensinamentos***

***À equipe da Biblioteca pela contribuição das correções e orientações das normas para este trabalho***

***A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior***

*"Até aqui nos ajudou o SENHOR." (1 Samuel 7:12)*

**SUMÁRIO**

**RESUMO** ..... **8**
**ABSTRACT** ..... **10**
**1 INTRODUÇÃO** ..... **14**
**2 PROPOSIÇÃO** ..... **19**
**3 MATERIAL E MÉTODOS** ..... **20**
**3.1 Preparação dos implantes** ..... **20**
**3.1.1 Técnica cirúrgica** ..... **21**
**3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)** ..... **23**
**3.1.3 Histologia** ..... **24**
**3.1.4 Nanotomografia Computadorizada** ..... **25**
**3.1.5 Citometria de Fluxo** ..... **27**
**3.1.6 Expressão gênica qPCR** ..... **28**
**3.1.7 Ensaio de osteoclastogênese (TRAP)** ..... **30**
**3.1.8 Análise estatística** ..... **31**
**4 RESULTADOS** ..... **32**
**4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)** ..... **32**
**4.1.1 Histologia** ..... **35**
**4.1.2 Nanotomografia Computadorizada** ..... **39**
**4.1.3 Citometria de Fluxo** ..... **40**
**4.1.4 Expressão Gênica qPCR** ..... **41**
**4.1.5 Ensaio da Osteoclastogênese (TRAP)** ..... **51**
**5 DISCUSSÃO** ..... **52**
**6 CONCLUSÃO** ..... **64**
**REFERÊNCIAS** ..... **65**
**ANEXO** ..... **67**

Carvalho LM. Análise *in vivo* da modulação óssea em implantes de titânio com superfície em nanoescala [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

## RESUMO

Nas últimas décadas houve um aumento considerável na utilização dos implantes metálicos para aplicações na área da ortopedia e odontologia, por isso as pesquisas têm como foco estudar os mecanismos biológicos de interação osso-implante. A nanotopografia de superfície de implantes osseointegráveis apresenta efeito direto sobre a resposta biológica óssea. No entanto a maneira como afeta a osseointegração *in vivo* ainda não está totalmente elucidada. O objetivo neste estudo foi comparar *in vivo* a influência da superfície em nanoescala (nano) confeccionada em implantes de titânio comercialmente puro (Ticp), comparado-a a superfície lisa (controle) em modelo experimental de camundongos osterix-mcherry (*Osx*-mcherry), os quais expressam proteína fluorescente concomitante com a expressão do gene osterix (*Osx*). Os animais receberam implantes de superfície lisa no fêmur direito e com nanoescala no fêmur esquerdo. Após diferentes períodos de eutanásia baseados na metodologia empregada foram realizados nas peças e nas células os seguintes testes biológicos: microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação da adesão celular e da superfície do implante; histologia e nanotomografia (nanoCT) para observação e quantificação de osso neoformado na interface osso/implante; citometria de fluxo para quantificação de células marcadas pelo gene osterix; PCR em tempo real (qPCR) para avaliação da expressão gênica; coloração fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) para contagem de osteoclastos. Nossos resultados mostraram que a maioria dos genes estudados estavam superexpressos nas amostras com superfície em nanoescala sendo que alguns deles apresentaram diferenças estatísticas (Teste t, $p < 0.05$), tais como: *Osx* (osterix), *Alp* (fosfatase alcalina), *Prx1*(homeobox relacionado emparelhado -1), *Dmp1* (Dolicol-fosfatase mannosiltransferase subunidade 1), *Bsp* (sialoproteína óssea) e *Ocn* (osteocalcina). Os testes estatísticos ANOVA *two way* seguido do Teste de Tukey quando necessário, foram utilizados para os demais experimentos e o nível de significância foi estabelecido em $p < 0.05$. Diferenças estatísticas foram encontradas para o nanoCT e histologia entre as superfícies e períodos avaliados e os melhores resultados foram observados para a nanoescala. A coloração TRAP também mostrou diferenças estatísticas entre as superfícies e períodos estudados, com a superfície lisa mostrando melhores resultados aos 3 dias e a nano aos 5 e 7 dias. Não houve diferença estatística para a citometria de fluxo, porém a superfície em nanoescala mostrou melhores

resultados que a lisa em todos os períodos analisados. Concluímos que a superfície em nanoescala possui propriedades osteocondutivas e favorece os eventos biológicos que ocorrem na superfície do implante melhorando o processo de osseointegração.

Palavras-chave: Titânio. Nanoescala. Osseointegração. Implantes.

*Carvalho LM. Analysis in vivo of bone modulation in titanium implants with nanoscale surface [doctorate thesis]. São José dos Campos(SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.*

## *ABSTRACT*

*In the last decades there has been a considerable increase in the use of metal implants for applications in the area of orthopedics and dentistry, so the researches are focused on studying the biological mechanisms of bone-implant interaction. Surface nanotopography of osseointegrated implants has a direct effect on the biological response of bone. However the way it affects osseointegration in vivo is not yet fully elucidated. The aim of this study was to compare the in vivo influence of the nanoscale surface (nano) made on implants of commercially pure titanium (Ticp) with the smooth surface (control), using an experimental model of osterix-mcherry mice (Osx-mcherry), which express fluorescent protein concomitant with osterix gene expression (Osx). The animals received implants with smooth surface in the right femur and nanoscale in the left femur. After different periods of euthanasia based on the methodology used, biological tests were performed in the femur and cells: scanning electron microscopy (SEM) for evaluation of cell adhesion and implant surface; histology and nanotomography (NanoCT) for observation and quantification of neoformed bone at implant interface; flow cytometry for quantification of cells marked by the osterix gene; Real-time PCR (qRT-PCR) for gene expression evaluation; tartrate resistant acid phosphatase staining (TRAP) for osteoclast counts. Our results showed that most genes studied were overexpressed in the nanoscale surface and some of which presented statistical differences(t Test, $p < 0.05$), such as: Osx (osterix), Alp (alkaline phosphatase), Prx1 (related paired homeobox), Dmp1 (Dolicol-phosphatase mannosyltransferase subunit 1), Bsp (bone sialoprotein) and Ocn (osteocalcin). The two-way ANOVA statistical test followed by the Tukey test when necessary were used for the other experiments and the level of significance was set at $p < 0.05$. Statistical differences were found for the nanoCT and histology between surface and periods evaluated and the best results were observed for the nanoscale. The TRAP staining also showed statistical differences between the surfaces and periods studied, with the smooth surface showing better results at 3 days and nano at 5 and 7 days. There was no statistical difference for flow cytometry, but the nanoscale surface showed better results than the smooth surface in all analyzed periods. We conclude that the nanoscale surface has*

*osteoconductive properties and improves the biological events that occur on implants surface improving the osseointegration process.*

*Keywords: Titanium. Nanoscale. Osseointegration. Implants.*

# 1 INTRODUÇÃO

O uso de implantes de titânio comercialmente puro (cp) para a reabilitação de pacientes edêntulos foi um dos maiores avanços da odontologia. Diversos estudos a nível molecular e celular já contribuíram para a definição deste biomaterial como um material compatível e vantajoso para substituição óssea (Mendonça et al., 2010), apresentando excelentes características físicas, químicas e de biocompatibilidade (Chakravorty et al., 2012) e portanto sendo o mais utilizado pela implantodontia na odontologia.

Os estudos no momento têm sido direcionados para a superfície do implante como um fator que contribui de diferentes maneiras para melhorar a osseointegração, com o máximo de eficiência e eficácia. A superfície ideal para aplicação nos implantes intra-ósseos é aquela seja capaz de promover adesão, migração, proliferação, diferenciação e viabilidade celular (Vandrokava, Bacakova, 2011). Quando o implante é colocado em contato com osso, a adesão do coágulo e formação da rede de fibrina permitem que a superfície deste seja colonizada por sangue e células tronco mesenquimais (Masuda et al., 1997; Berglundh et al., 2003; Meyer et al., 2004). Estas células conduzem a elaboração e modificação da interface osso/implante resultando em formação óssea em contato direto com a superfície dos implantes (Mendonça et al., 2010).

Segundo Le Guéhennec et al. (2007) a superfície do implante afeta o contato direto com o osso, a rapidez com que ocorre a neoformação óssea e a natureza da conexão mecânica osso/implante. Kulkarmi et al. (2015) afirmam que a resposta do hospedeiro ao biomaterial depende completamente da biocompatilidade e das propriedades da superfície do material. Fabbro et al. (2017) acreditam que a série de modificações químicas e físicas na superfície do implante tem como objetivo melhorar a bioatividade superficial, a interação com

o osso circundante e, em última instância, a sua capacidade de desencadear e manter o implante osseointegrado.

Portanto, a modificação da topografia de superfície do material é um dos critérios mais importantes para a produção de biomateriais, pois acredita-se que sejam decisivos para a interação célula-material e para a integração do material com o tecido circundante (Clark, 1994; Ito, 1999; He et al., 2008).

Diante disso, as pesquisas têm se concentrado nas propriedades estruturais dos implantes que mimetizem o ambiente bioquímico e biofísico *in vivo* (Bressan et al., 2013). Os avanços recentes tecnológicos que abrangem a geração de estruturas de micro e em nanoescala foram traduzidos com sucesso para o desenvolvimento de materiais implantáveis, a qual esta sendo destinada a melhorar a sua atratividade para células e, portanto otimizar a integração deste com o tecido circundante (Vandrokava, Bacakova, 2011).

A ideia de que alterações em nível micro e nanométrico podem afetar a neoformação óssea por meio da interação desta com o ambiente celular, permitiu o direcionamento e melhoramento das superfícies dos implantes utilizando-se de técnicas capazes de criar estruturas em escala micro e nanométricas.

A nível microscópico, o recobrimento da superfície permitiu a criação da microescala, que parecer estar ligado ao recrutamento, função e adesão celular (Variola et al., 2008). Com os avanços na área da nanotecnologia, o desenvolvimento de estruturas a nível nanométrico, a qual deve ter ao menos uma das três dimensões variando entre 1 a 100 nanômetros (Meirelles, 2010), tornou-se possível. Acredita-se que a nanoescala pode induzir a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, responsáveis pela neoformação e mineralização da matriz óssea (Stanford, 2008).

Na literatura existem descritos diversos tratamentos de superfície que produzem as superfícies micro e nanoescala. Para a criação de estruturas em microescala são utilizadas algumas técnicas, que podem ser realizadas sozinhas

ou combinadas (Meirelles, 2010). Dentre elas destacam-se o ataque ácido com ácido clorídrico e o ácido sulfúrico em determinadas concentrações ou jateamento realizado por óxidos (dióxido de titânio, óxido de alumínio, fosfato de cálcio ou areia) (Damião, 2011). Para a obtenção de superfície em nanoescala, existem diversas técnicas, das quais pode-se destacar o ataque ácido. combinado com outros métodos (jateamento e/ou peroxidação) que além de produzir as nanocaracterísticas na superfície também remove contaminantes (Mendonça et al., 2008)

Muitos autores descrevem a superfície em nanoescala como apresentando melhor resposta celular quando comparada a superfície micro, pois acredita-se que melhore a adesão e espalhamento dos osteoblastos, (Webster et al., 2000; Christenson et al., 2007; Khang et al,. 2008; Liu et al., 2010) oferecendo maior suporte para a proliferação celular (Mendonça et al., 2008; Mendonça et al., 2010; Vandracova et al., 2011; Huang et al., 2016; Yin et al., 2016)

Webster et al. (2000) e Price et al. (2004) descreveram as superfícies nanoestruturadas como aquelas que mimetizam a nanoarquitetura natural dos tecidos e o tamanho de algumas moléculas da matriz extracelular ou as irregularidades destas, o que conduz a melhor adsorção de proteínas.

Em seu estudo, de Oliveira e Nanci (2004) utilizaram implantes de titânio cp e TiAlV em combinação com soluções de $H_2SO_4$ e $H_2O_2$ com a finalidade de obter superfície em nanoescala para compará-las a superfície sem tratamento, após cultivo com células osteoblásticas obtidas de calvária de rato. Foi investigada a expressão da *Bsp* (sialoproteína óssea), *Opn* (osteopontina), Fibronectina e *Col1* (colágeno tipo I), já que estes constituintes da matriz óssea têm sido associados com os eventos iniciais da formação óssea. Os resultados demonstraram que a superfície com característica nano pode influenciar os

estágios mais precoces da osteogênese, além de influenciar na adesão e migração de células osteoblásticas.

Mendonça et al. (2010) também produziram em discos de titânio cp superfície em nanoescala utilizando a combinação de 2N $H_2SO_4$ e 30% $H_2O_2$ (50/50 volume), para comparar a expressão gênica das CTMh (células tronco mesenquimais humanas) em discos lisos e previamente jateados com partículas de óxido de alumínio ($Al_2O_3$) de 100μm. Os resultados demonstraram melhor resposta para os discos em nanoescala, com aumento relativo da expressão dos genes *RUNX2* e *OSX* (osterix) que são fatores de transcrição chave para diferenciação osteoblástica.

As células tronco mesenquimais (CTMs) são definidas como células capazes de se autorregenerar e se diferenciar em vários tecidos especializados (Suchaneka et al., 2009). No processo de neoformação óssea pós cirurgia de colocação do implante, as células tronco mesenquimais podem se diferenciar em linhagens celulares osteoblásticas e não osteoblásticas, participando ativamente da osseointegração, sendo capazes de formar uma estrutura óssea sadia para ancorar o implante (Bressan et al., 2013). Estas células têm grande interação com topografia de superfície, mostrando-se sensíveis ao nanoambiente, o que permite concluir que o ambiente topográfico é importante para a diferenciação celular e formação de tecido ósseo (Bressan et al., 2013).

Karazisis et al. (2017) afirmam que já está bem estabelecido que a rugosidade em microescala desempenha papel importante no tecido cicatricial e na fixação do implante, enquanto que o papel da superfície em nanoescala tem sido insuficientemente investigado em uma maneira sistemática *in vivo*. Além disso, uma abrangente compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à interação celular e tecidual com topografia em nanoescala *in vivo* ainda não foi claramente elucidada.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi a criação de topografia de superfície em nanoescala em implantes de titânio cp com a utilização de $H_2SO_4$ e $H_2O_2$ para compará-las a superfície controle lisa em osso medular do fêmur de camundongos (células tronco mesenquimais -CTM) Osterix-mcherry (*Osx*-mcherry) que expressam proteína fluorescente concomitante com a expressão do gene osterix, buscando avaliar a capacidade de diferenciação celular das CTMc em osteoblastos, bem como o processo de neoformação óssea.

# 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo neste estudo foi avaliar *in vivo* a influência da superfície em nanoescala em implantes de titânio comercialmente puro (Ticp) no processo de osseointegração, comparado-a a superfície lisa (controle) em modelo experimental de camundongos osterix-mcherry (*Osx*-mcherry), os quais expressam proteína fluorescente concomitante com a expressão do gene osterix (*Osx*).

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido em parceria com a University of Michigan, por meio do Programa de Doutorado Sanduíche (PDSE) - CAPES.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais na University of Michigan - UMICH em Ann Arbor - Michigan (UCUCA - protocolo PRO00006203).

## 3.1 Preparação dos implantes

Os 96 fios de titânio comercialmente puro grau IV foram previamente confeccionados com o diâmetro de 0,9 mm e comprimento de 8 mm, correspondente ao longo eixo do fêmur dos camundongos.

Para obtenção da superfície em nanoescala, 48 implantes foram jateados com partículas de $Al_2O_3$ de 100µm e lavados 3 vezes em água Milli-Q para então serem tratados com 30% $H_2O_2$ e 2N $H_2SO_4$ *overnight* na proporção de 1:1.

Após o tratamento, todos os implantes foram lavados em ultrassom para remoção de resíduos, conforme descrito abaixo:

a) Três lavagens com Água - 5 minutos;
b) Uma lavagem com Álcool 70% - 15 minutos.

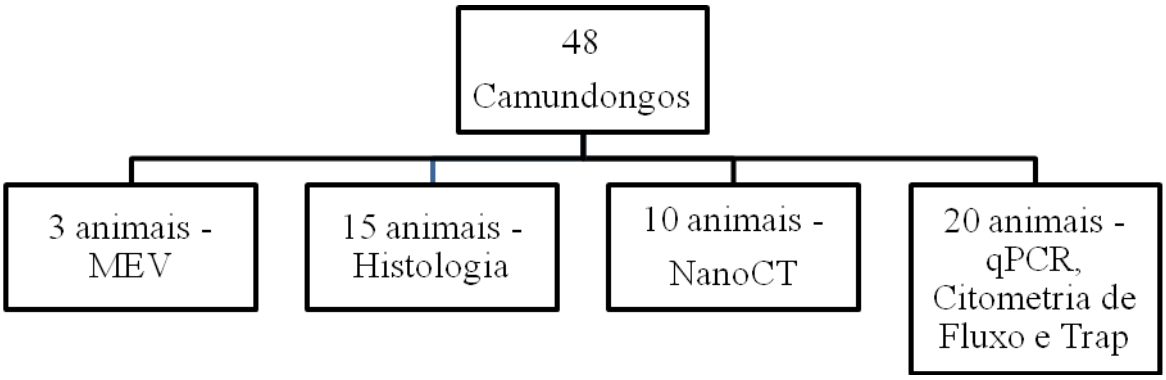
O álcool foi sugado e os implantes colocados no fluxo para evaporação do mesmo e posteriormente permaneceram 15 minutos sob luz ultravioleta (UV) para esterilização.

### 3.1.1 Técnica cirúrgica

Foram utilizados 48 camundongos *Osx*-mCherry para colocação dos implantes e conforme o fluxograma apresentado na figura 1, cada teste utilizou diferentes números de animais para análise.

O camundongo *Osx*-mCherry foi desenvolvido pelo Dr. Peter Maye (University of Connecticut) e expressa proteína fluorescente concomitante com a expressão do gene osterix. Para o procedimento cirúrgico cada animal apresentou o peso médio de 30 gramas. Os implantes foram colocados no fêmur através de uma artrotomia parapatelar medial.

Figura 1- Fluxograma da quantidade de animais por teste

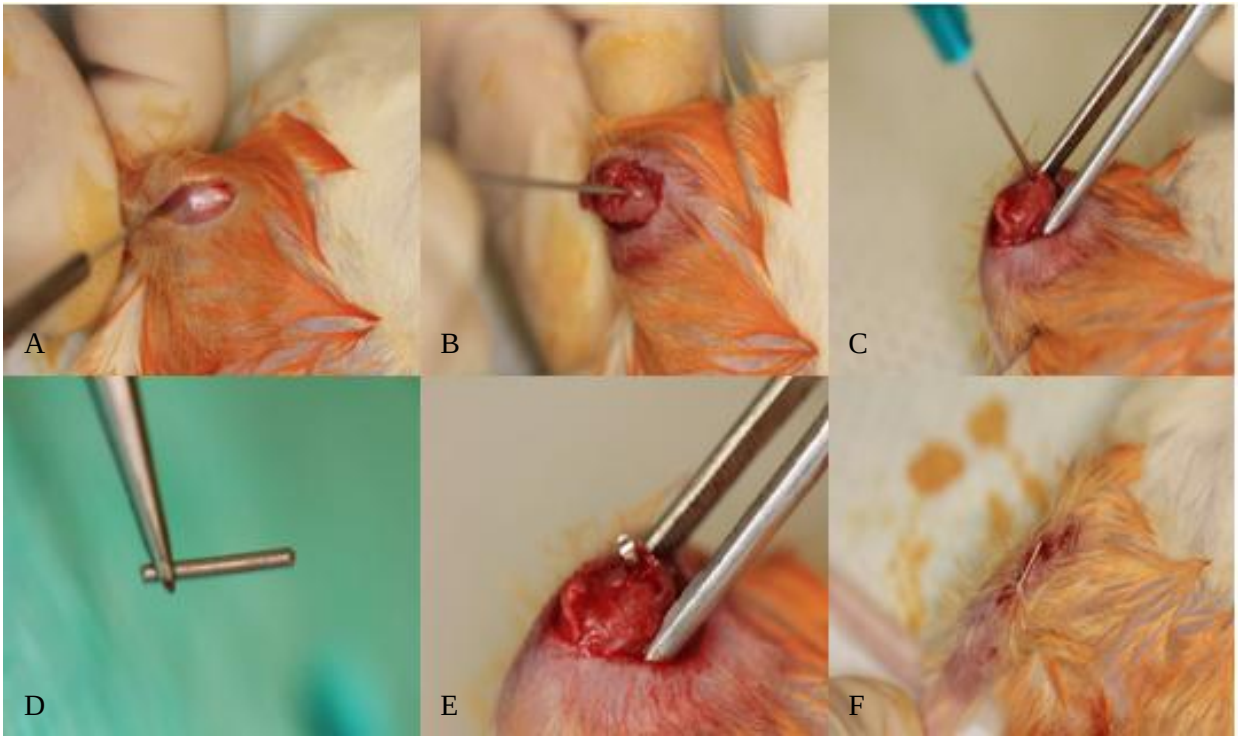



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os camundongos foram anestesiados por meio de anestesia inalatória, utilizando-se isofluorano 2% e medicados pré cirurgicamente com antiinflamatório a base Carprofen® (5 mg/kg) via subcutânea.

A região da cirurgia foi submetida a tricotomia e assepsia com iodo e a incisão foi realizada na região parapatelar medial com descolamento e afastamento do complexo muscular. Após a localização da fossa intercondilar femoral, o canal intramedular foi perfurado manualmente e gradualmente com agulhas de calibre 25, 23 e 20, como ilustrado na figura 2.

Figura 2- Técnica cirúrgica para colocação do implante no longo eixo do fêmur do camundongo




Legenda: a) Incisão parapatelar; b) Perfuração do canal intramedular; c) Uso de agulha de diferentes calibres para aumento do canal intramedular; d) Implante de titânio cp; e) Colocação do implante; f) Sutura.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Para padronização os fêmures direitos receberam implantes lisos e os esquerdos os implantes em nanoescala em todas as cirurgias.

Os tecidos foram reposicionados através de sutura com fio Vicryl® 5-0 (Ethicon, San Angelo, TX, USA). Os animais foram novamente medicados com Carprofen® (5 mg/kg) via subcutânea 24 horas pós-cirúrgico.

Ração e água foram fornecidas *ad libitum* após os camundongos estarem totalmente recuperados. Os animais foram mantidos em gaiolas em grupos de cinco, alojados a uma temperatura ambiente de 21°C e mantidos em um ciclo de luz/escuro de 12/12h. A eutanásia ocorreu através da inalação de dióxido de carbono.

### 3.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura 3 animais foram eutanasiados, um para cada período (3, 7 e 10 dias), os implantes foram cuidadosamente removidos dos fêmures e imediatamente colocados em paraformaldeído (Z-Fix) por 1 hora para serem fixados.

As amostras foram lavadas três vezes com tampão fosfato salino (PBS) frio (Gibco) e desidratadas numa série graduada de concentrações de etanol de 10% a 100% por 15 minutos, durante um período de 1 hora e meia. Foi realizada a desidratação em etanol por 15 minutos a 100% por três vezes. Após desidratação, adicionou-se hexametilsililazano (Sigma) às amostras e o conteúdo foi colocado no fluxo até evaporação completa do líquido para então serem montadas em *stubs* e pulverizadas com paládio-ouro.

Os 6 implantes, 3 lisos e 3 em nanoescala, foram examinados sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução (Philips XL30

FEG, SEM, Philips, Eindhoven, Netherlands) localizado na University of Michigan - NCRC - Ann Arbor.

As análises e imagens foram realizadas em três pontos escolhidos ao acaso nas superfícies dos implantes de cada grupo em diferentes magnitudes.

### 3.1.3 Histologia

A eutanásia para o exame histológico foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a cirurgia, com n=5 para cada período. Os fêmures foram removidos e limpos, eliminando todo tecido muscular, bem como as epífises proximais e distais. Em seguida os conjuntos osso/implante foram fixados em paraformaldeído (Z-Fix) e mantidos em geladeira para descalcificação.

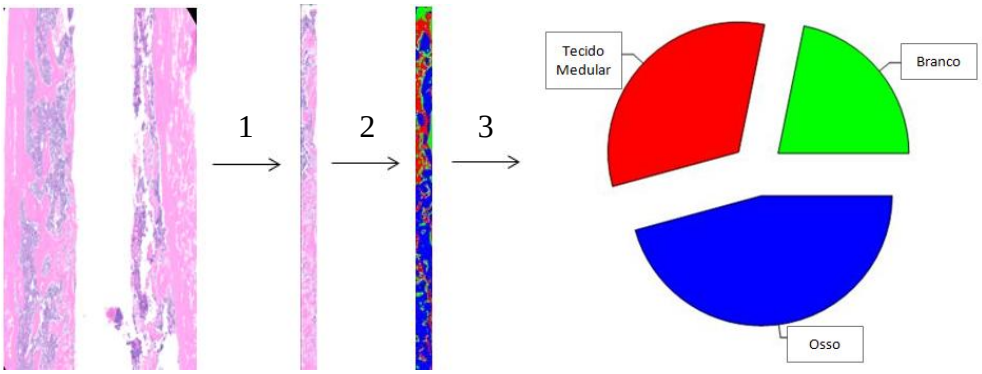
As amostras foram descalcificadas com EDTA (Merck, San Diego, CA USA) por 7 dias em câmara gelada a 4°C e sob constante agitação. Após descalcificação, os implantes foram removidos, as peças ósseas foram lavadas em água Milli-Q, imersas em paraformaldeído (Z-Fix) e enviadas para o laboratório de histologia da School of Dentistry (Faculdade de Odontologia) na University of Michigan - Ann Arbor para coloração em hematoxilina e eosina.

Devido a subjetividade do exame histológico para a quantificação de tecido ósseo neoformado, após a coloração em H&E as lâminas foram fotografadas e analisadas no programa LEICA versão 4.10 pela ferramenta Phase Expert localizado no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos- ICT- da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP. O programa mede automaticamente microestruturas multifásicas indicadas por cores distintas presentes na amostra.

A figura 3 ilustra o passo a passo para análise das lâminas histológicas. Na ferramenta do Phase Expert do programa da LEICA, as imagens das lâminas foram seccionadas em áreas de aproximadamente 2000 $\mu m^2$ cada, sendo uma do lado direito e outra do lado esquerdo na interface osso/implante (seta 1). As estruturas presentes, as quais são chamadas de fases no programa, foram pré definidas por cores (seta 2), sendo a cor azul atribuída ao osso e a vermelha a. A cor verde foi atribuída as regiões denominadas de branco e entraram na análise para compor 100% da amostra. Isto foi necessário devido as diferentes inclinações do implante em relação ao osso e também a presença de regiões que não receberam coloração (artefatos, por exemplo).

Desta forma o programa calculou a quantidade de osso e tecido medular na área selecionada e gerou os gráficos (seta 3). A área de cada uma das fases foi calculada em $\mu m^2$ e os lados direito e esquerdo somados para análise estatística.

Figura 3- Análise das imagens histológicas por fases




Legenda: Imagem da lâmina histológica completa. Seta 1: Secção de imagem. Seta 2: Definição das fases. Seta 3: Gráfico com resultados.
Fonte: Elaborado pelo autor.

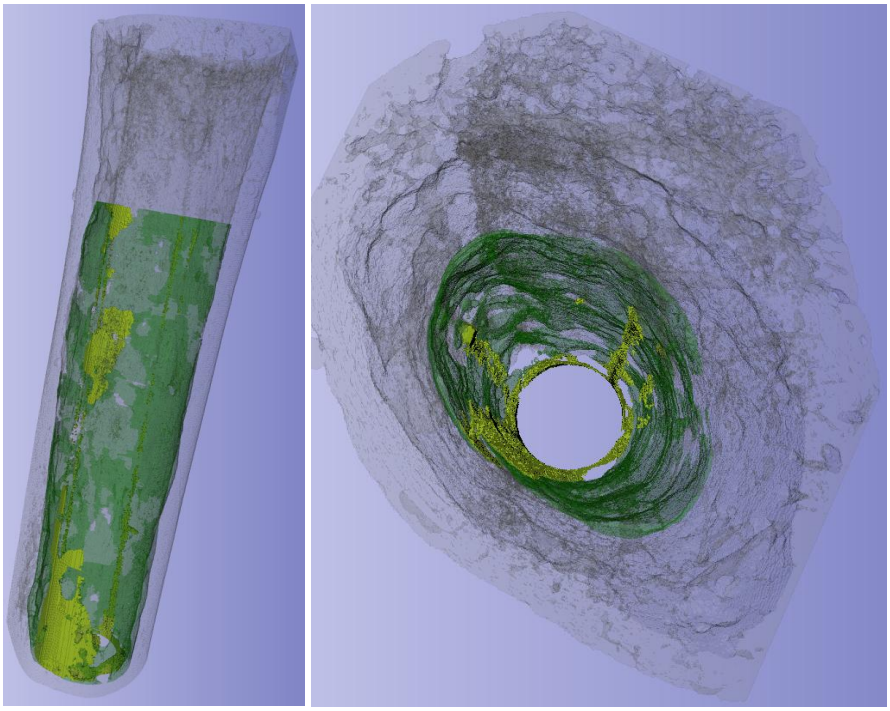
### 3.1.4 Nanotomografia Computadorizada

Os animais operados para a NanoCT foram eutanasiados aos 14 e 21 dias, com n=5 para cada período. Os fêmures direito e esquerdo foram

removidos, limpos e fixados em paraformaldeído (Z-Fix). Foi realizada análise não-destrutiva do osso neoformado na interface osso/implante. A peça de tecido ósseo contendo o implante foi submetida ao nanotomógrafo GE Nanotom S nanoCT system, localizado na University of Michigan, Orthopaedic Research Laboratories - Ann Arbor. As amostras foram escaneadas com rotação das peças em 360º, utilizado raios-x monocromático com 90 keV e 702 µA. Os softwares NRecon e Dataviewer foram utilizados para a reconstrução das imagens e os softwares CT-Analyzer, CT-Vol para a quantificação da formação óssea. O volume ósseo em uma área circular de 990 µm ao redor do implante (área de interesse) foi então calculado baseado no volume total da área analisada.

A figura 4 ilustra como foi realizada a reconstrução das imagens e seleção da área de interesse.

Figura 4- Reconstrução da imagem e seleção da área de interesse

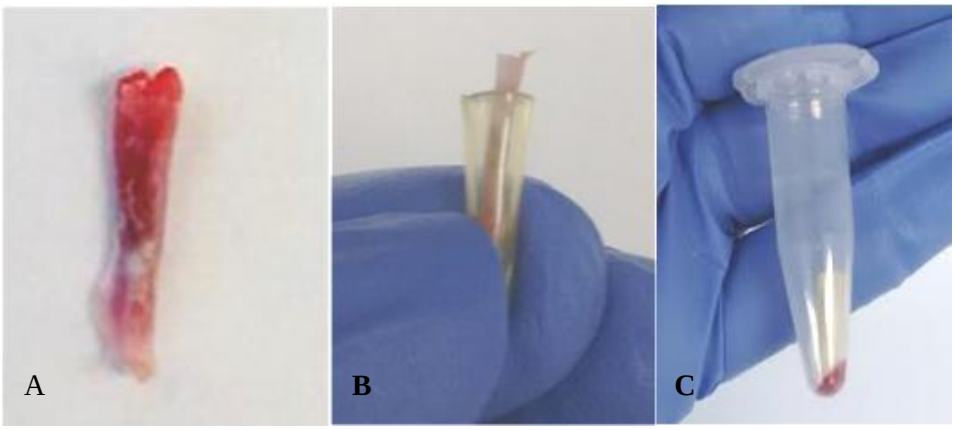


Legenda: Osso medular: verde escuro; Espaço vazio: implante; Amarelo: área de interesse - osso em contato com o implante.
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.1.5 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi realizada aos 1, 3, 5 e 7 dias, com n=5 para cada período de eutanásia. Os implantes foram removidos e utilizados para análise da expressão gênica, qPCR, como será mostrado no tópico a seguir. O fêmur foi colocado em uma ponteira de 200 µl cortada, o conjunto inserido em um eppendorff de 1 ml e centrifugado a 15.000 rpm por 5 minutos para coleta das células tronco mesenquimais. A figura 5 mostra como foi realizado o passo a passo para obtenção das células.

Figura 5- Preparação do osso para obtenção de células do canal medular ósseo




Legenda: a) Fêmur sem epífises e limpo; b) Preparação para centrifugação; c) Após a centrifugação com pellet de células tronco mesenquimais de camundongos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O osso foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 ml de meio ALFA MEM modificado com Sais de Earle (MEM-α) (Gibco—Life, Grand Island, NY, USA) suplementado com soro fetal bovino (Gibco) a 10% e antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina (Sigma Chemical Co,St Louis, MO, USA).

Cem mil células foram centrifugadas em 1000 rpm por 3 minutos para que o ALFA MEM pudesse ser descartado e as células fossem ressuspendidas em 1 ml de BSA (10 ml de PBS + 100mg BSA) em tubos de 5 ml poliestireno com fundo redondo. As amostras foram imediatamente colocadas em gelo e transportadas para a leitura na citometria de fluxo localizada na University of Michigan - NCRC - Ann Arbor

Foram utilizados um animal para controle positivo (presença de fluorescência para o osterix) e um negativo (ausência de fluorescência para o osterix) para cada dia de eutanásia. Estes animais não receberam implantes.

### 3.1.6 Expressão Gênica qPCR

Para realização da expressão gênica por meio do qPCR os camundongos foram operados e eutanasiados aos 1, 3, 5 e 7 dias, com n=5 para cada período.

O teste foi realizado nos implantes que foram removidos cuidadosamente dos fêmures, colocados imediatamente em tubos de 1,5 ml contendo reagente de lise Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e congelados a -80°C por no mínimo 24 horas. O RNA total foi isolado de acordo com o protocolo do fabricante do Trizol e recolhido por precipitação com etanol. De cada amostra foi utilizada uma fração de 1µl de cada para a quantificação do RNA que foi realizada com auxílio do espectrofotômetro (PowerWave HT - BioTek Instruments) e do programa Gen5™ (BioTek Instruments). O cDNA foi sintetizado com 300ng do RNA seguindo as recomendações do fabricante (SuperScript VILO cDNA Synthesis – Invitrogen).

Para análise da expressão gênica foram selecionados genes osteogênicos e inflamatórios conforme ilustrado no quadro 1.

Quadro 1 - Genes osteogênicos e inflamatórios

| **GENES OSTEOGÊNICOS** | **GENES INFLAMATÓRIOS** |
|---|---|
| *Runx2* | *Tnf- α* |
| *Osx* | *Nos2* |
| *Prx1* | *Il-1β* |
| *Alp* | *Il-10* |
| *Col1* | *Arg-1* |
| *Bmp2* | |
| *Satb2* | |
| *Dmp1* | |
| *Bsp* | |
| *Ocn* | |

Legenda: (R*unx2*): Runt relacionado ao fator de transcrição 2 ; (*Osx*): Osterix; (P*rx1*): Homeobox 1 relacionado emparelhado; (*Alp*): Fosfatase alcalina; (*Col1*): Colágeno tipo 1; (*Bmp2*): Proteína morfogenética óssea 2; (*Satb2*): Sat homeobox 2; (*Dmp1*): Dolicol-fosfatase mannosiltransferase subunidade 1 (*Bsp*): Sialoproteína óssea; (*Ocn*): Osteocalcina; (*Tnf-a*): Fator de necrose tumoral - alfa, (*Nos2*): Óxido nítrico sintase 2 ;(*Il-lβ* ): Interleucina beta ; (*Il-10*): Interleucina 10, (*Arg-1*): Arginase1
Fonte: National Center for Biotechnology Information. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene.

Foram utilizados os primers disponíveis comercialmente RT² qPCR™ Primer Assay (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA) para PCR em tempo real (Real time quantitative PCR). As reações foram preparadas utilizando o SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante em um termociclador ABI 7000 (Applied Biosystems). A expressão relativa do mRNA foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e expressa como nível relativo de expressão. Como controle interno foi utilizado o gene GAPDH (gene endógeno constitutivo).

### 3.1.7 Ensaio de osteoclastogênese (Coloração TRAP)

Para identificar os osteoclastos, o ensaio da TRAP (Sigma Aldrich®) foi realizado com as mesmas células coletadas para a citometria de fluxo, portanto seguindo os mesmos procedimentos para coleta com n=5 para cada período de eutanásia (1,3,5 e 7 dias).

As células foram plaqueadas em garrafas de 75 $cm^2$ em meio ALFA MEM modificado com Sais de Earle (MEM-α) (Gibco—Life, Grand Island, NY, USA) suplementado com soro fetal bovino (Gibco) a 10% e antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) a 37º C e $CO_2$ a 5%. As células foram cultivadas *overnight* para a coleta apenas do sobrenadante.

O sobrenadante foi centrifugado a 1000 rpm por 3 min e $1x10^5$ células foram plaqueadas em 100 µl de meio ALFA MEM suplementado em placas de 96 poços em triplicata.

Em cada poço foi adicionado 100 µl da mistura de RANK -L (receptor activator of nuclear factor-KB ligand) e M-CSF (monocyte-colony stimulation factor) Peprotech ® em meio ALFA MEM suplementado, na proporção de 2 µl cada reagente a cada 1 ml de meio. Após 3 dias a coloração TRAP (Acid Phosphatase, Leukocyte Kit - Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA) foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Após a coloração, as placas permaneceram secando por período mínimo de 6 horas para que fosse possível a contagem das células com 3 ou mais núcleos.

### 3.1.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do PCR real time foram mostrados como fold change (expressão relativa) pelo método $2^{-\Delta\Delta C}$, na baseline 2, sendo o Liso dia 1 usado como o controle. O Test - t foi utilizado como teste estatístico para comparação entre o controle liso dia 1 e os demais grupos. Para os demais testes foi utilizado ANOVA *two way* seguido do Teste de Tukey quando necessário. O software utilizado para análise estatística foi Prism 6 (Graphpad Software INC, La Jolla, CA, USA). Para todas as análises estatísticas, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0.05$.

# 4 RESULTADOS

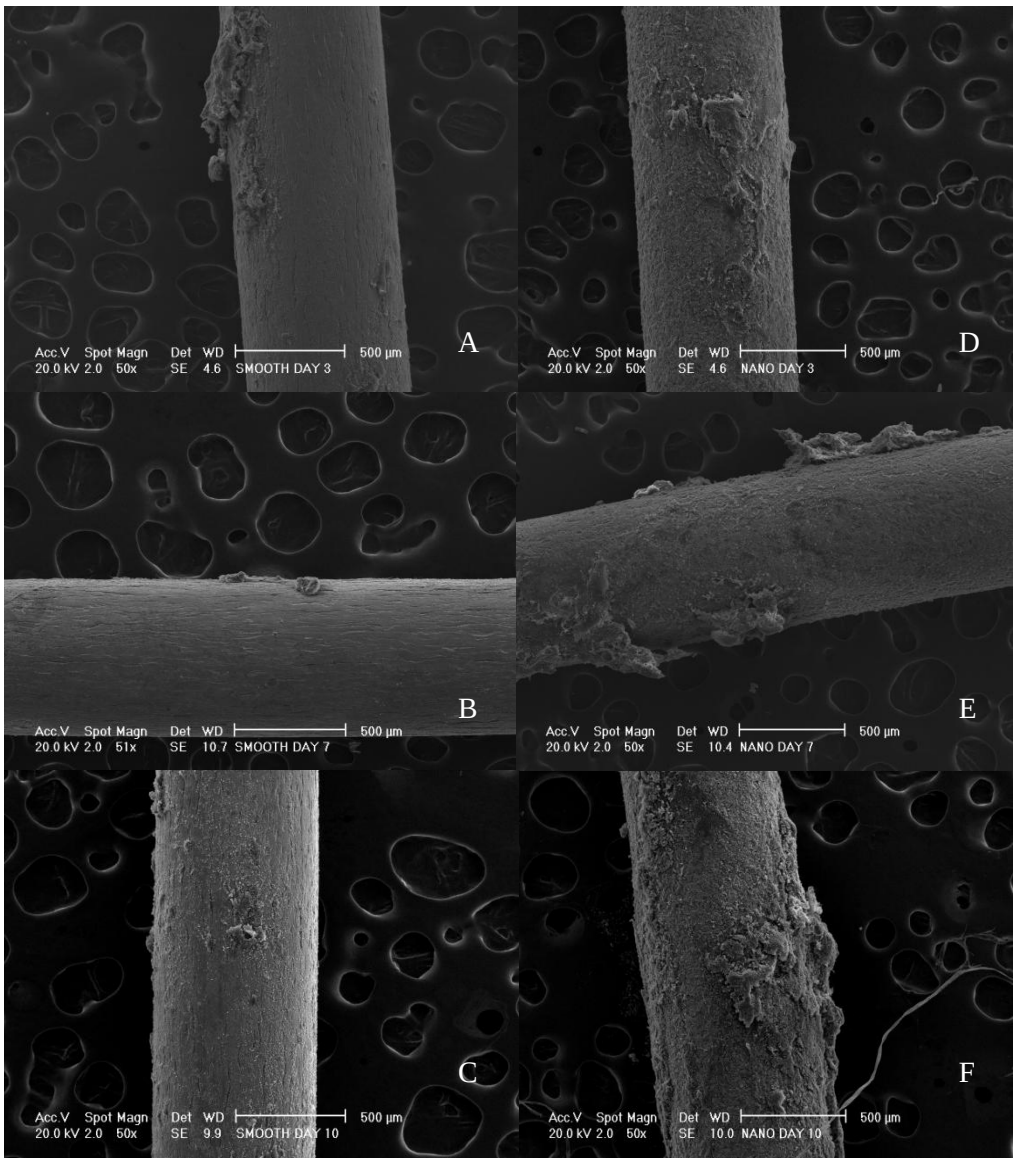
## 4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Pela análise das imagens sob MEV foi possível observar as diferenças entre as superfícies lisa e em nanoescala promovida pelo jateamento e imersão em ácido.

As figuras 6A, 6B e 6C mostram os implantes lisos e as figuras 6D, 6E e 6F mostram os implantes com nanoescala em magnitude de 50x. Em todas as imagens observou-se a adesão celular ao implante, porém notou-se mais células aderidas na superfície em nanoescala no dia 10.

Na figura 7 as superfícies dos implantes estão em magnitude de 100x, onde é possível observar melhor as rugosidades criadas pelo tratamento em nanoescala. As figuras 7A, 7B e 7C mostram as superfícies lisa e as figuras 7D, 7E e 7F mostram as superfícies em nanoescala.

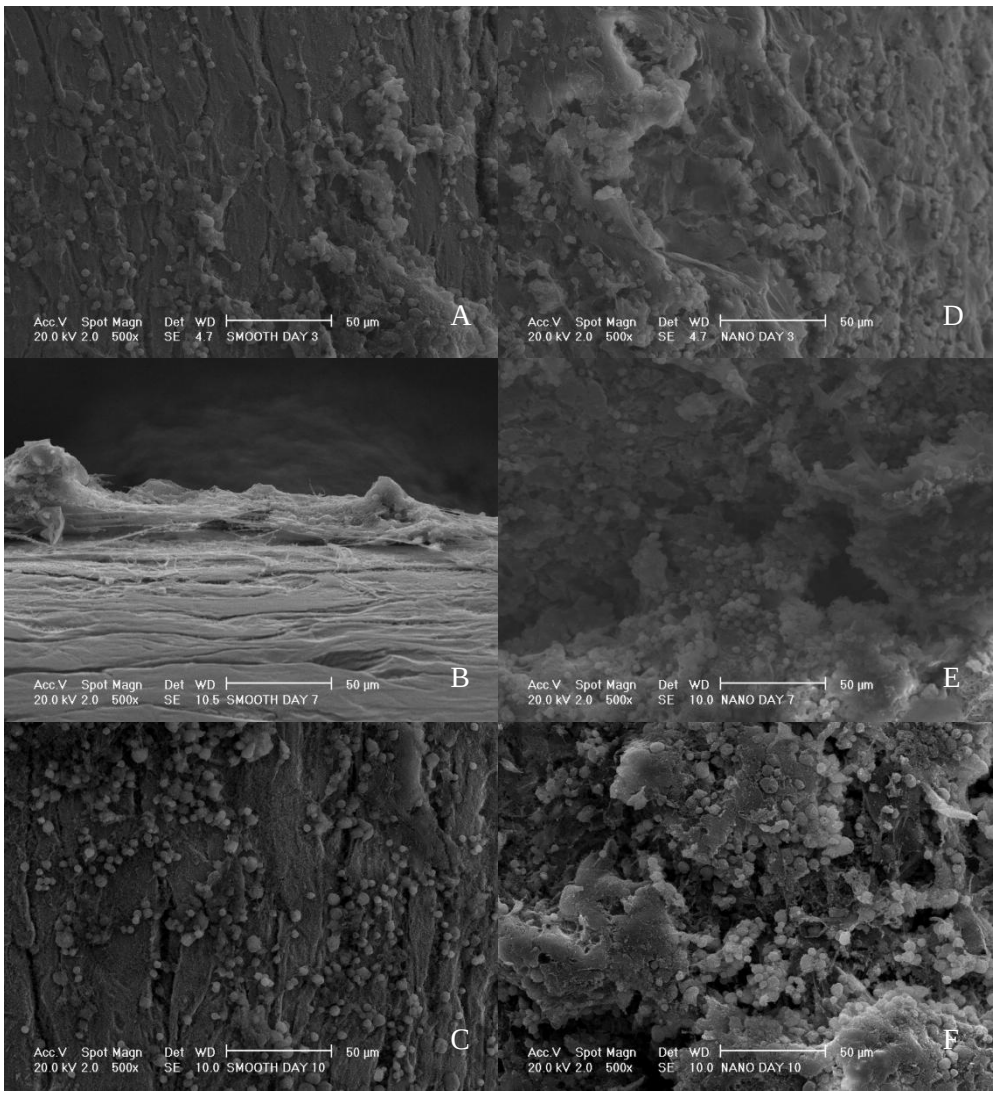
Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura das superfícies lisa/ nano após a procedimento cirúrgico e eutanásia de 3, 7 e 10 dias em magnitude de 50x




Legenda: A) Smooth day 3: Liso dia 3; B) Smooth day 7: Liso dia 7; C) Smooth day 10: Liso dia 10; D) Nano day 3: Nanoescala dia 3; E) Nano day 7: Nanoescala dia 7; F) Nano day 10: Nanoescala dia 10.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7- Microscopia eletrônica de varredura das superfícies lisa/ nano após a procedimento cirúrgico e eutanásia de 3,7 e 10 dias em magnitude de 100x




Legenda: A) Smooth day 3: Liso dia 3; B) Smooth day 7: Liso dia 7; C) Smooth day 10: Liso dia 10; D) Nano day 3: Nanoescala dia 3; E) Nano day 7: Nanoescala dia 7; F) Nano day 10: Nanoescala dia 10.
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.1.1 Histologia

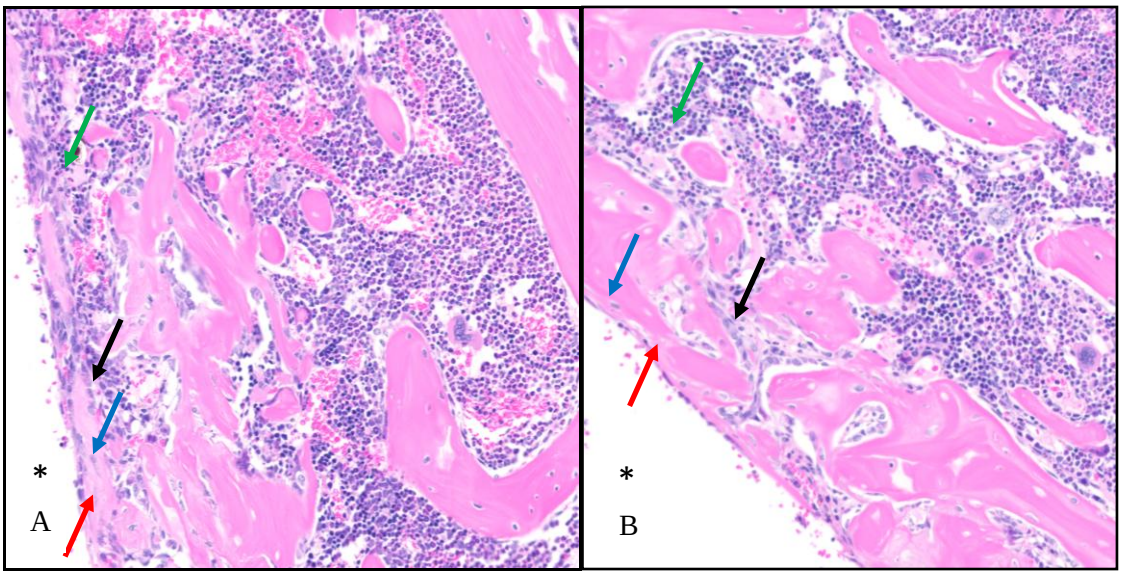
A análise das lâminas histológicas mostrou neoformação óssea nos períodos de 7 e 14 dias na interface dos implantes liso e nano. Aos 7 dias constatou-se que o osso na interface era imaturo e não lamelar nas duas superfícies estudadas, as quais também mostraram presença de osteoblastos cuboidais em fileira única margeando as trabéculas de osso neoformado, com

citoplasma basófilo indicando células ativas no processo de neoformação óssea. Foram observados osteócitos cuboidais aprisionados aleatoriamente na matriz osteóide. Aos 14 dias verificou-se o início da remodelação óssea para ambas as superfícies, porém o osso neoformado ainda mostrou-se não lamelar e com o mesmo tipo e padrão celular apresentado aos 7 dias. Foi observada presença de osteoclastos em ambos os períodos e superfícies analisados.

Aos 21 dias não foi notada presença de osso na interface osso/implante em nenhuma das duas amostras estudadas, o que foi atribuído ao processo de osseointegração e ao momento da remoção do implante que possivelmente pode ter causado laceração do tecido.

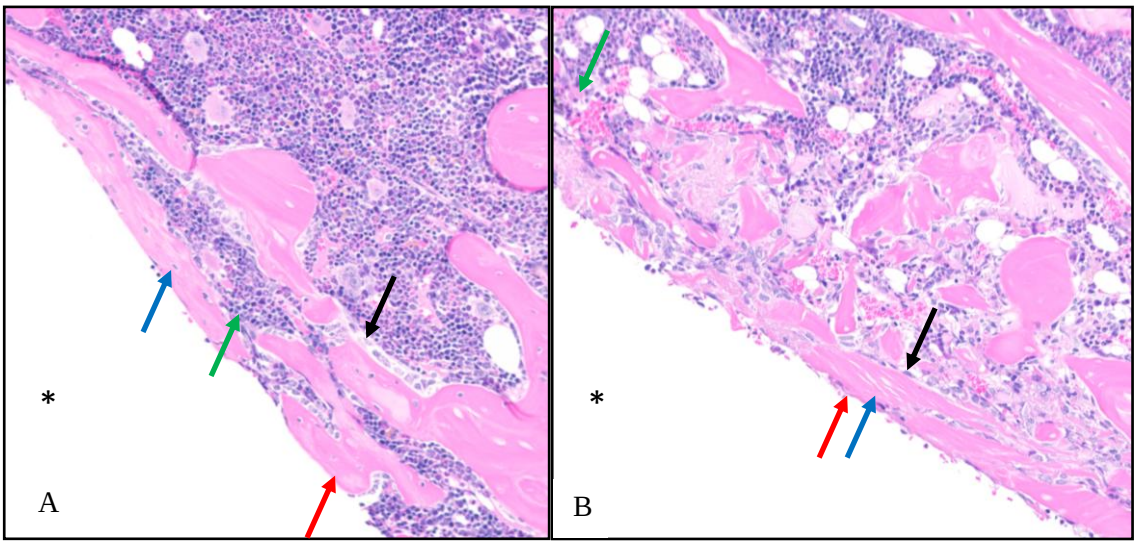
Em ambos os períodos e superfícies estudados observou-se presença de tecido medular com aspecto de normalidade contendo linfócitos esparsos. As figuras 8A, 9A e 10A mostram imagens das lâminas histológicas da superfície lisa e as figuras 8B, 9B e 10B da superfície  nano em magnitude de 200 x aos 7, 14 e 21 dias respectivamente.

Figura 8- Imagem histológica do fêmur que recebeu os implantes liso/nano mostrando neoformação óssea na interface osso/implante aos 7 dias



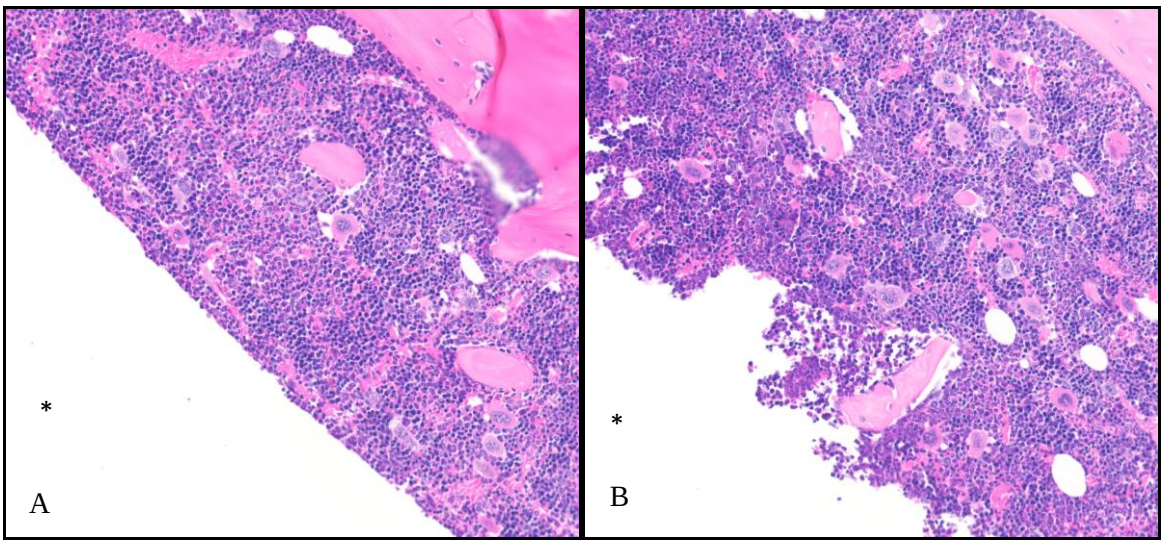

Legenda: A) Superfície Lisa; B) Superfície nano. Seta vermelha: osso neoformado; Seta azul:osteócitos cuboidais; Seta preta: osteoblastos cuboidais em fileira única; Seta verde: tecido medular;* Espaço preenchido pelo implante.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9- Imagem histológica do fêmur que recebeu os implantes liso/nano mostrando neoformação óssea na interface osso/implante aos 14 dias




Legenda: A) Superfície Lisa; B) Superfície nano. Seta vermelha: osso neoformado; Seta azul:osteócitos cuboidais; Seta preta: osteoblastos cuboidais em fileira única; Seta verde: tecido medular; * Espaço preenchido pelo implante.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10- Imagem histológica do fêmur que recebeu os implantes liso/nano mostrando ausência de tecido ósseo na interface osso/implante e presença apenas de tecido medular aos 21 dias




Legenda: A) Superfície Lisa; B) Superfície nano. Presença de tecido medular e ausência de osso na interface osso/implante; * Espaço preenchido pelo implante.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados da análise histológica no programa da Leica pela ferramenta Phase Expert demonstraram-se melhores para a nanoescala nos 3 períodos avaliados. No entanto, observamos uma diminuição da quantidade de osso neoformado aos 21 dias devido a possível laceração do tecido. Esta possível dilaceração foi comprovada pela análise seguinte por nanoCT.

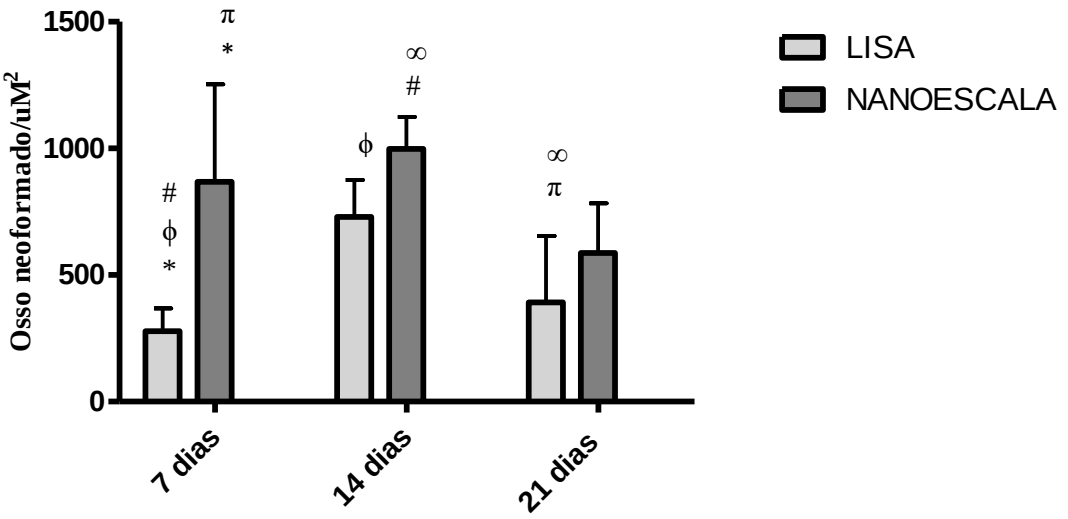
A figura 11 mostra o gráfico representativo da média e desvio padrão das superfícies e períodos estudados. A análise do ANOVA *two way* ($p < 0.05$) constatou diferenças entre as superfícies e os períodos analisados, com p=0.0004 e p=0.0044, respectivamente. O teste de Tukey ($p < 0.05$) mostrou as comparações entre as superfícies e períodos, revelando diferenças estatísticas conforme sumarizado no quadro 2.

Quadro 2- Teste de Tukey mostrou diferenças estatísticas entre as superfícies e os períodos analisados

| ***Superfície x Período*** |
|---|
| Lisa 7 dias x Nano 7 dias |
| Lisa 7 dias x Lisa 14 dias |
| Lisa 7 dias x Nano 14 dias |
| Nano 7 dias x Lisa 21 dias |
| Nano 14 dias x Lisa 21 dias |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11- Gráfico representativo das médias da quantidade de osso neoformado($\mu m^2$) na interface osso/implante aos 7, 14 e 21 dias




Legenda:* Diferenças estatísticas entre as superfícies lisa e nano aos 7 dias; ϕ diferenças estatísticas na superfície lisa aos 7 e 14 dias; # diferenças estatísticas entre a superfície lisa aos 7 dias e nanoescala aos 14 dias; π diferenças estatísticas entre a superfície nano aos 7 dias e lisa aos 21 dias; ∞ diferenças estatísticas entre a superfície nano aos 14 dias e lisa aos 21 dias.
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.1.2 Nanotomografia Computadorizada

Nossos resultados mostraram que houve pequena diferença no volume ósseo neoformado na interface do implante aos 14 dias para as duas superfícies sem diferenças estatísticas. Aos 21 dias pudemos observar maior volume ósseo na superfície nano em comparação a lisa, no entanto não houve diferença estatística significante para as duas amostras no período analisado.

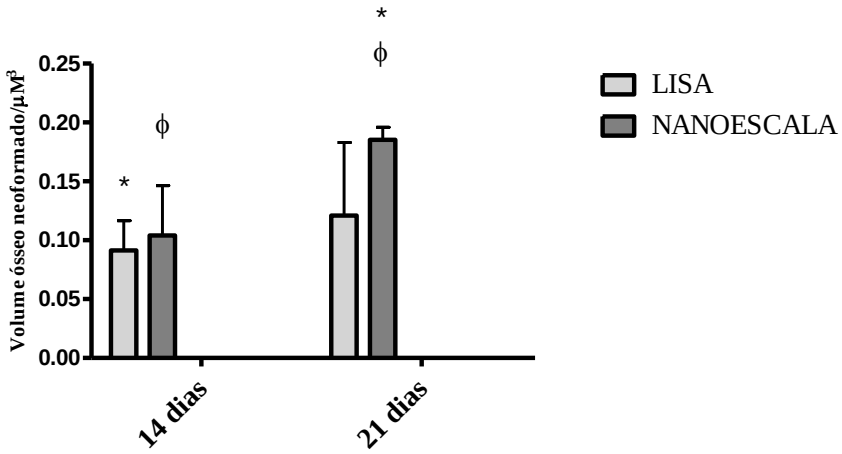
Diferenças estatísticas foram observadas pelo teste ANOVA *two way* ($p< 0.05$) nas superfícies entre os dois períodos estudados, 14 e 21 dias, com p=0,0146.

Subsequente o teste de Tukey ($p< 0.05$) avaliou as comparações entre as superfícies e os períodos estudados. Os resultados apontaram diferenças

estatísticas com nível de significância na superfície lisa aos 14 dias em comparação com a nano aos 21 dias e na superfície nano aos 14 e 21 dias.

A figura 12 ilustra o gráfico da média e o desvio padrão do volume ósseo neoformado nas duas superfícies aos 14 e 21 dias e as diferenças estatísticas.

Figura 12- Gráfico representativo das médias do volume ósseo neoformado na interface osso/implante aos 14 e 21 dias



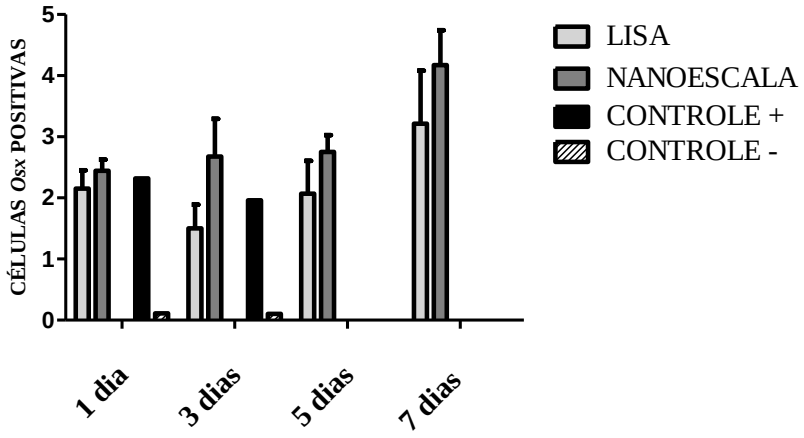

Legenda:* Diferenças estatísticas entre amostra lisa 14 dias e nanoescala 21 dias; ϕ diferenças estatísticas entre as amostras nano 14 dias e nano 21 dias.
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.1.3 Citometria de fluxo

Camundongos transgênicos *Osx*-mCherry foram utilizados para a citometria de fluxo com o objetivo de quantificar as células marcadas pela proteína fluorescente concomitantemente ao gene *Osx*. A figura 13 mostra a média e desvio padrão da quantidade de células marcadas pelo *Osx*, mostrando que houveram diferenças na quantificação destas células, porém o teste estatístico ANOVA *two way* ($p < 0.05$) não apontou diferenças estatísticas entre os grupos.

Na superfície em nanoescala a quantidade de células que expressaram o gene osterix foi maior em todos os dias analisados em comparação à superfície lisa e até mesmo ao controle positivo, que não recebeu o implante, mas que possuía a marcação para o gene.

Figura 13- Gráfico representativo da citometria de fluxo mostrando a média da quantidade de células marcadas pelo *Osx*. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos e períodos analisados




Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.1.4 Expressão gênica qPCR

A informações relacionadas a expressão dos genes osteogênicos de aparecimento precoce e tardio, bem como os inflamatórios encontram -se nos quadros 3 e 4 respectivamente. Os resultados mostram os níveis relativos de expressão em relação ao grupo controle Liso dia 1 (Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) com n = 5.

No quadro 3 está a relação dos genes osteogênicos, identificados em roxo os genes de aparecimento precoce e os tardios em laranja. No mesmo quadro, encontram-se os dados do fold change, que em azul mostram os genes

que tiveram expressão baixa (pelo menos duas vezes menor que o grupo controle) e os em vermelhos aqueles que foram superexpressos (pelo menos duas vezes mais que o grupo controle).

Quadro 3- Nível de expressão dos genes osteogênicos. O RNA total foi isolado com 1, 3, 5 e 7 dias

| | | Fold Change comparando ao Grupo controle Liso dia 1 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Liso Dia 1 | Nano dia 1 | Liso dia 3 | Nano dia 3 | Liso dia 5 | Nano dia 5 | Liso dia 7 | Nano dia 7 |
| Simbolo | Fold Change | Fold Change | Fold Change | Fold Change | Fold Change | Fold Change | Fold Change | Fold Change |
| *Runx2* | 1 | 1,1986 | 1,5377 | 1,8375 | 1,6386 | 1,7199 | 4,0439 | 2,4431 |
| *Osx* | 1 | 0,7356 | 0,882 | 0,5972 | 1,4925 | 2,0388 | 2,8325 | 11,2621 |
| *Prx1* | 1 | 0,5999 | 3,6043 | 2,167 | 1,119 | 2,5195 | 3,4145 | 2,047 |
| *Alp* | 1 | 0,1733 | 0,4151 | 0,2644 | 0,5212 | 0,8322 | 1,8088 | 2,4224 |
| *Col1* | 1 | 0,1442 | 0,4807 | 0,4679 | 0,7076 | 1,3186 | 2,4109 | 4,5534 |
| *Bmp2* | 1 | 0,9834 | 0,6362 | 0,429 | 0,5126 | 0,8071 | 0,7588 | 0,7619 |
| *Sabt2* | 1 | 0,3848 | 0,6983 | 0,4358 | 0,7816 | 1,4077 | 1,1732 | 2,76 |
| *Dmp1* | 1 | 0,2111 | 0,3098 | 0,2718 | 1,9504 | 3,4235 | 4,4215 | 11,9747 |
| *Bsp* | 1 | 0,1684 | 0,5569 | 0,5116 | 1,0398 | 2,1709 | 2,8798 | 4,2127 |
| *Ocn* | 1 | 0,1514 | 0,2491 | 0,2196 | 0,9472 | 1,1576 | 2,785 | 11,5925 |

Fonte: http://www.sabiosciences.com/PCRArrayPlate.php.

No quadro 4 estão marcados os genes pró inflamatórios em verde e os anti-inflamatórios em azul e os respectivos valores do fold change.

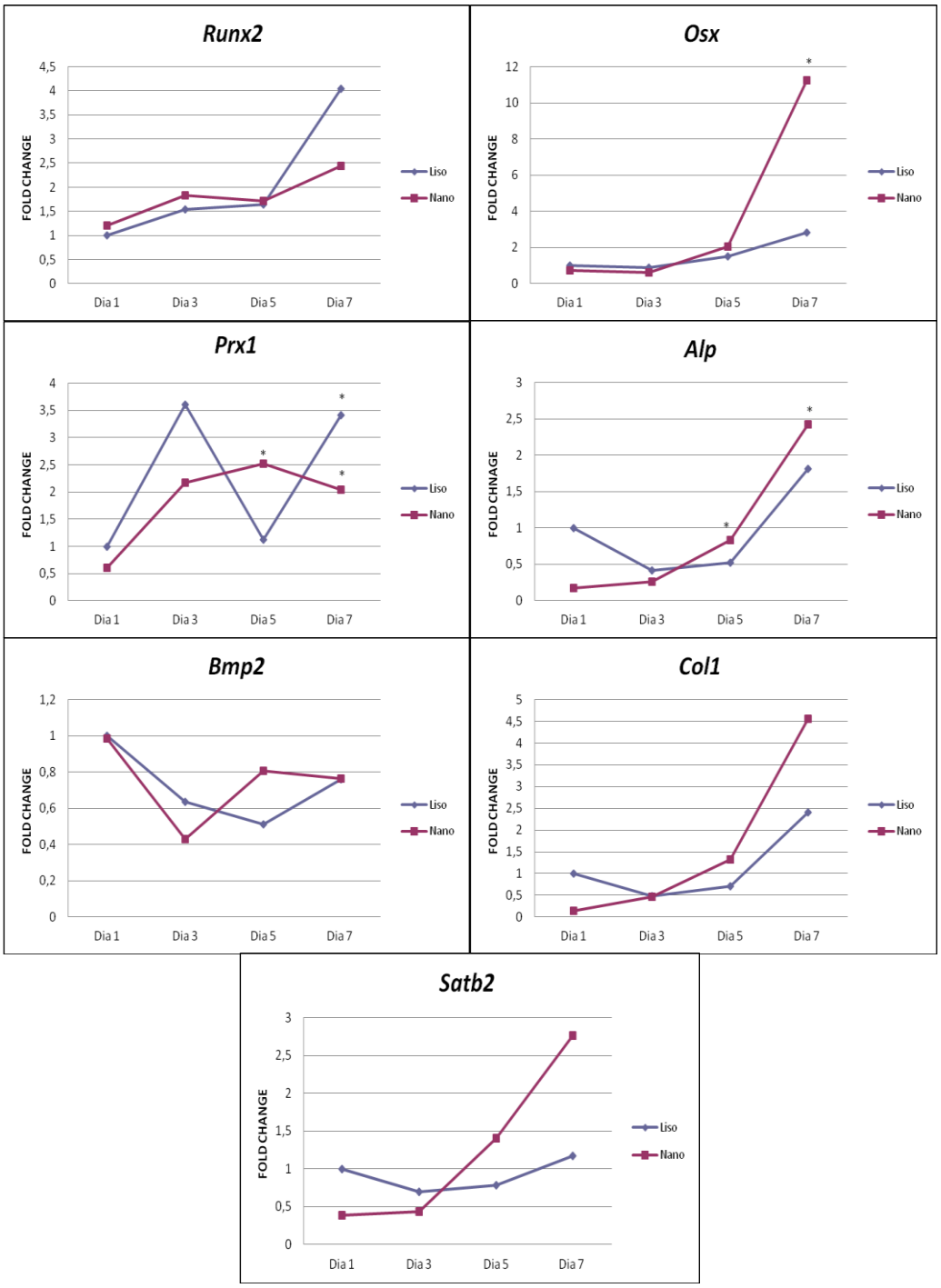
Quadro 4- Nível de expressão dos genes inflamatórios. O RNA total foi isolado com 1, 3, 5 e 7 dias

| | | Fold Change comparando ao Grupo controle Liso dia 1 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Liso Dia 1 | Nano dia 1 | Liso dia 3 | Nano dia 3 | Liso dia 5 | Nano dia 5 | Liso dia 7 | Nano dia 7 |
| Simbolo | Fold Change | Fold Change | Fold Change | Fold Change | Fold Change | Fold Change | Fold Change | Fold Change |
| *Tnf-α* | 1 | 1,6584 | 2,4471 | 2,8051 | 0,9549 | 0,7396 | 1,7585 | 0,8802 |
| *Nos2* | 1 | 2,7029 | 1,6593 | 0,6331 | 0,2649 | 0,5249 | 0,5093 | 0,1582 |
| *Il-1 ß* | 1 | 3,5666 | 6,1182 | 11,4184 | 9,8842 | 6,1287 | 11,2864 | 5,5162 |
| *Il-10* | 1 | 1,4633 | 1,1128 | 0,7536 | 0,6383 | 0,8741 | 0,7298 | 0,6992 |
| *Arg-1* | 1 | 2,7925 | 4,632 | 1,4002 | 0,343 | 1,4199 | 0,225 | 0,1032 |

Fonte: http://www.sabiosciences.com/PCRArrayPlate.php.

A figura 14 mostra os níveis de expressão (fold change) dos genes osteogênicos precoces para os dias 1, 3, 5 e 7 em comparação ao controle liso do dia 1.

Figura 14- Nível de expressão gênica osteogênico relativo para os genes de aparecimento precoce. RNA total foi isolado nos dias 1, 3, 5 e 7 dias. Os resultados são mostrados na expressão relativa para o grupo controle Liso dia 1 (Method $2^{-\Delta\Delta Ct}$) n=5



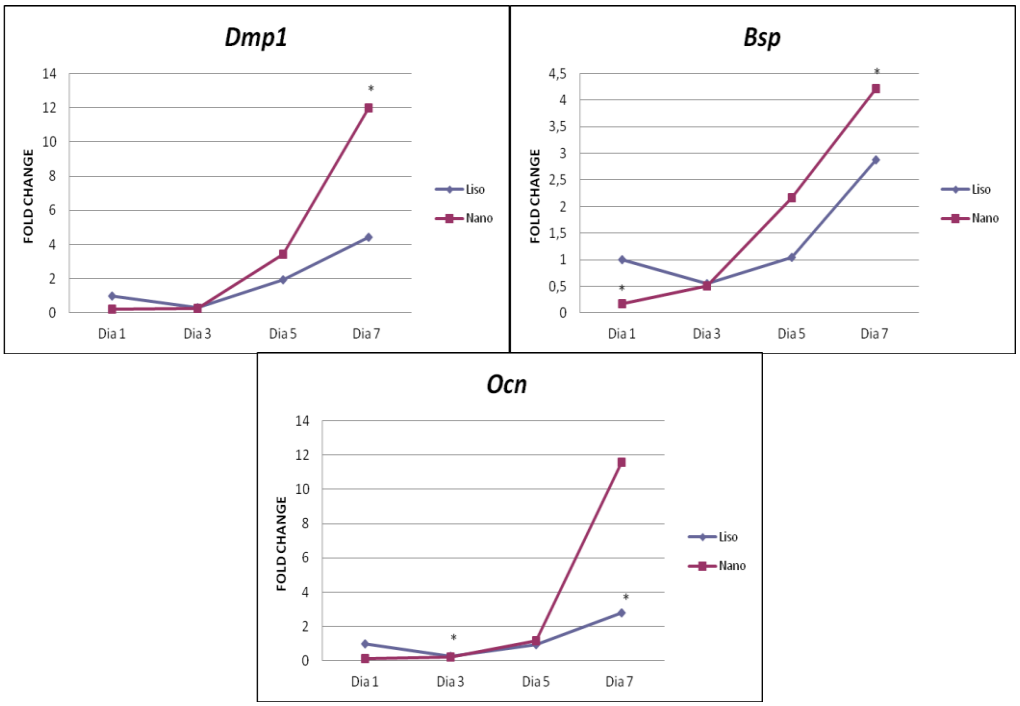

Legenda: * Diferenças estatísticas $p < 0.05$ quando comparado ao Liso dia 1.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A superexpressão do *Runx2*, fator chave de transcrição dos osteoblastos, aconteceu aos 7 dias para ambas as superfícies, no entanto na superfície lisa apresentou-se 4 vezes mais expresso enquanto na nanoescala 2,5 vezes mais expresso que o controle. O gene *Osx* também um fator chave de transcrição para diferenciação dos osteoblastos apresentou superexpressão a partir do dia 5 na nanoescala com valores próximos a linha de base, chegando ao seu pico máximo aos 7 dias, apresentando expressão quase 6 vezes maior que a linha de base, mostrando neste dia diferenças estatísticas em relação ao grupo controle. Na superfície lisa este gene iniciou sua expressão também aos 7 dias com valores próximos a linha de base.

O gene *Prx1* mostrou superexpressão na superfície lisa aos 3 e 7 dias, com diferenças estatísticas apenas no dia 7 e com baixa expressão nos dias 1 e 5. Na superfície em nanoescala, este gene mostrou padrão de expressão mais constante, com valores acima da linha de base a partir do dia 3, no dia 5 apresentou-se 2,5 vezes mais expresso que o controle e aos 7 dias mostrou ligeira queda de expressão com níveis próximos alinha de base, mostrando diferenças estatísticas nos dia 5 e 7. O *Alp* mostrou superexpressão 2,5 vezes maior para a nanoescala no dia 7 em relação ao grupo controle, apresentando diferenças estatísticas neste período e no dia 5, apesar deste dia apresentar baixos níveis de expressão gênica. A superfície lisa mostrou baixa expressão do *Alp* em todos os períodos analisados. O *Col1* apresentou superexpressão no dia 7, sendo que a superfície em nanoescala mostrou 4,5 vezes mais expresso e a lisa 2.5 vezes mais expresso que o controle. O *Bmp2* apresentou baixa expressão para as duas superfícies analisadas em todos os períodos. A superexpressão do *Satb2* ocorreu apenas para a superfície em nanoescala no dia 7, com valor de fold change acima de 2,5.

A figura 15 mostra os resultados da expressão para os genes tardios.

Figura 15- Nível de expressão gênica osteogênico relativo para os genes de aparecimento tardio. RNA total foi isolado nos dias 1, 3, 5 e 7 dias. Os resultados sãos mostrados na expressão relativa para o grupo controle Liso dia 1 (Method $2^{-\Delta\Delta Ct}$) n=5




Legenda: * Diferenças estatísticas $p < 0.05$ quando comparado ao Liso dia 1.
Fonte: Elaborado pelo autor.

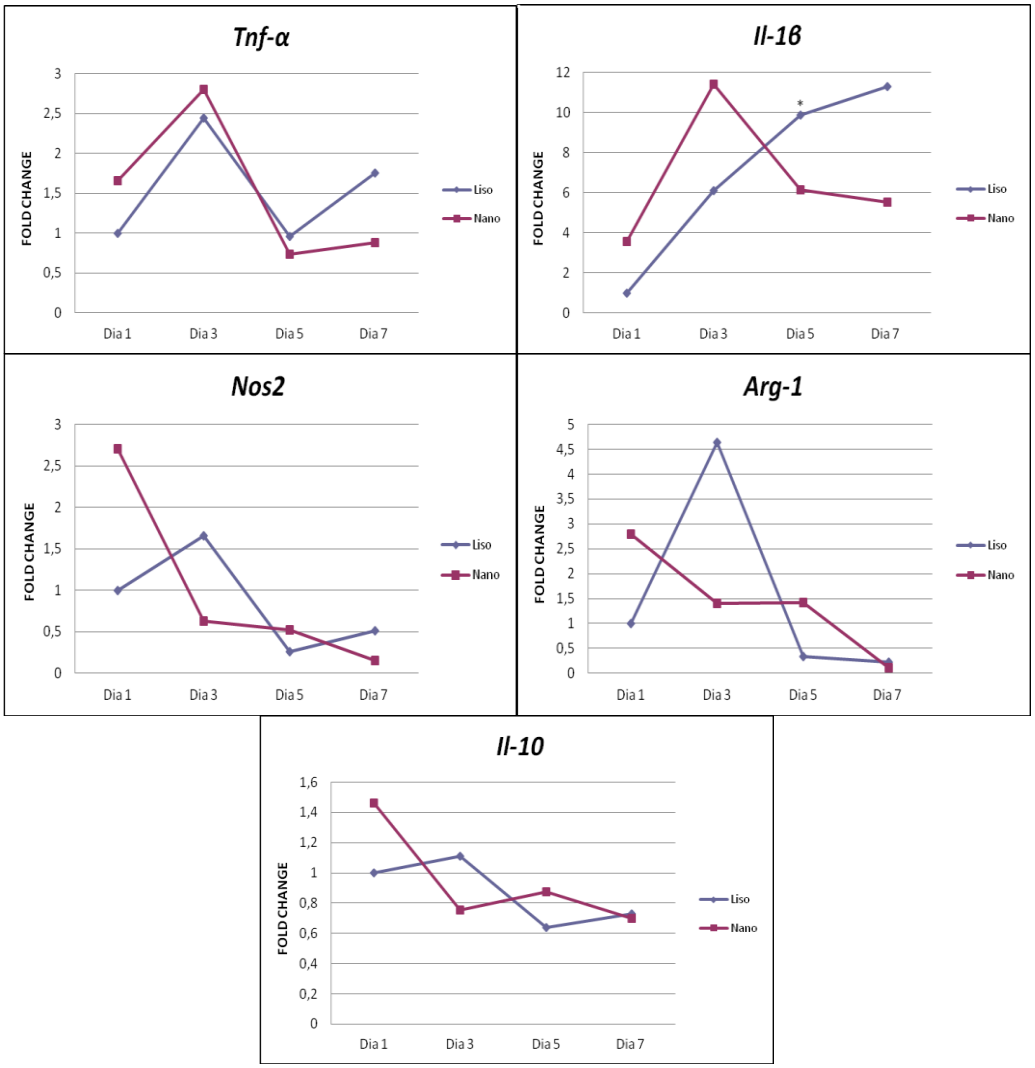
O nível expressão dos genes tardios *Dmp1* e *Bsp* com valores acima da linha de base, respectivamente 4 vezes e 2 vezes maiores que o controle, inicia-se aos 5 dias para a superfície em nanoescala e no mesmo período apenas para o gene *Dmp1* na superfície lisa, o qual apresentou-se 2 vezes mais expresso que o controle.

Todos os genes de expressão tardia, *Dmp1*, *Bsp* e *Ocn* estavam superexpressos em ambas as superfícies no dia 7, no entanto a superfície em nanoescala exibiu os maiores valores de expressão relativa, com o *Dmp1* e *Ocn* apresentando expressão 12 vezes maior e a *Bsp* 4 vezes maior que o controle. A superfície lisa apesar de apresentar níveis de expressão mais baixa, mostrou *Dmp1* com níveis de expressão 4 vezes maior que o controle e *Bsp* 3 vezes mais maior que o grupo controle, enquanto que o *Ocn* exibiu valores muitos próximos

a linha de base. As diferenças estatísticas ocorreram aos 7 dias para ambas as superfícies, nos genes *Dmp1* e *Bsp* para a superfície em nanoescala e na *Ocn* para a superfície lisa aos 3 e 7 dias.

Os genes inflamatórios também foram divididos em pró e anti inflamatórios, conforme ilustrado no quadro 4. A figura 16 mostra o padrão de expressão gênica destes genes.

Figura 16- Nível de expressão gênica relativo para os genes pró e anti inflamatórios. RNA total foi isolado nos dias 1, 3, 5 e 7 dias. Os resultados sãos mostrados na expressão relativa para o grupo controle Liso dia 1 (Method $2^{-\Delta\Delta Ct}$) n=5




Legenda: * Diferenças estatísticas $p < 0.05$ quando comparado ao Liso dia 1.
Fonte: Elaborado pelo autor.

As superfícies estudadas apresentaram padrões muitos diferentes de expressão gênica para os genes inflamatórios. Para os genes pró inflamatórios no dia 1 o *Tnf-α* é o único com baixos níveis de expressão gênica para ambas as superfícies. O *Il-1β* e *Nos2* apresentam superexpressão para a superfície em nanoescala, respectivamente 4 e quase 3 vezes mais expressos que o controle, já a superfície lisa apresenta baixa expressão gênica para esses genes neste período. No dia 3 há um aumento da expressão gênica para os genes *Tnf-α* e *Il-1β* para ambas as superfícies, com a a superfície nano mostrando fold change de respectivamente 3 e 12, e a superfície lisa apresentando 2,5 e 6 vezes mais expressos que o controle respectivamente. Nos períodos subsequentes aos 3 dias, o *Nos2* exibiu baixa expressão, abaixo dos níveis da baseline para ambas as superfícies. Nos dias 5 e 7 os níveis de expressão gênica de *Tnf*-α para as duas superfícies foi abaixo dos valores da baseline. Já *Il-1β* mostrou um padrão crescente de expressão apenas para a superfície lisa, mostrando 10 e 11 vezes mais expresso que o controle. A superfície em nanoescala para estes dias mostrou queda na expressão gênica, no entanto seus valores estão acima da baseline, com fold change mostrando os valores de 6 e 4 respectivamente . Diferenças estatísticas foram observadas apenas no gene *Il-1β*, na superfície lisa aos 3 dias.

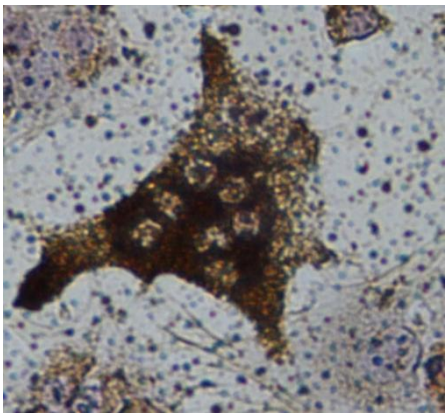
Dos genes anti-inflamatórios, apenas a *Arg-1* apresentou valores acima da baseline, para a superfície nano do dia 1, 3 vezes mais expresso que o controle e na lisa apenas no dia 3 com nível de expressão gênica 4,5 vezes maior que o controle. *O Il-10* mostrou baixa expressão para ambas as superfícies em todos os períodos analisados.

### 4.1.5 Coloração TRAP (ensaio de osteoclastogênese)

A utilização do CSF e RANK-L em combinação com a coloração das culturas de células da linhagem hematopoiéticas para a TRAP e para os núcleos possibilitou a visualização de células multinucleadas. A figura 17 apresenta uma imagem representativa da coloração histoquímica da TRAP.

Baseado na visualização dos núcleos, foi possível proceder com a contagem das células com 3 ou mais núcleos, considerados osteoclastos.

Figura 17- Visualização das células multinucleadas e positivas para a TRAP



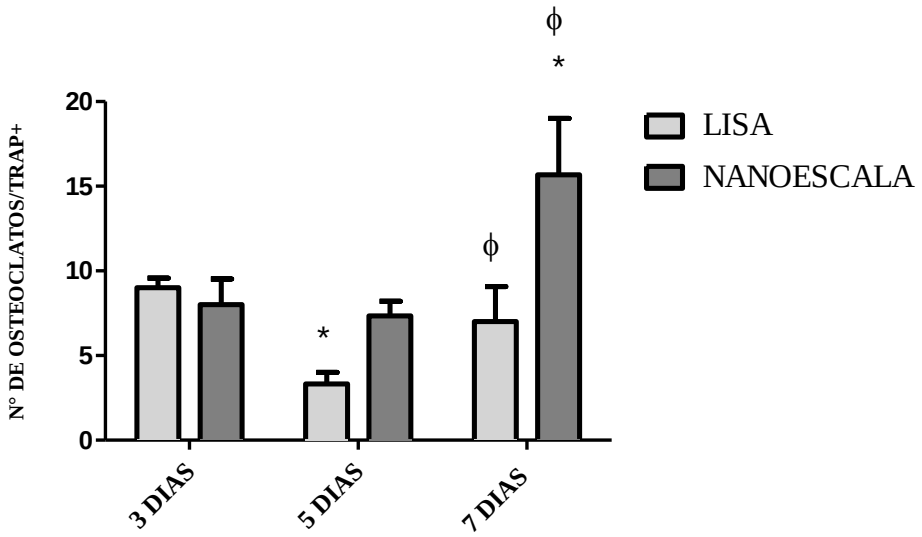
Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 18 ilustra o gráfico da contagem de osteoclastos com a média e o desvio padrão. O gráfico mostra maior quantidade de osteoclastos para a superfície lisa apenas no dia 3. Aos 5 e 7 dias a superfície em nanoescala obteve maior número destas células, no entanto o dia 5 em comparação aos outros períodos foi o que apresentou menor contagem de osteoclastos para ambas as superfícies.

O teste estatístico ANOVA *two way* (p< 0.05) mostrou diferenças estatísticas entre as superfícies com p= 0,0210 e os períodos com p= 0,0192.

Procedeu-se então com teste de Tukey (p< 0.05) o qual avaliou as comparações entre as superfícies e os períodos estudados, mostrando diferenças estatísticas entre a superfície lisa aos 5 dias e nanoescala aos 7 dias e entre a superfície lisa e nanoescala aos 7 dias

Figura 18- Gráfico representativo da média e desvio padrão da contagem de osteoclastos




Legenda: * Diferenças estatísticas entre a superfície lisa aos 5 dias e nano aos 7 dias; ϕ Diferenças estatísticas entre a superfície lisa e nano aos 7 dias.
Fonte: Elaborado pelo autor.

# 5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, estudos *in vitro* tem sido publicados mostrando os efeitos benéficos das superfícies nanoestruturas na osseointegração. No entanto poucos estudos questionam a influência das nanoestruturas sobre o comportamento celular e o exato papel desta superfície nos eventos moleculares da osseointegração *in vivo* (Thalji et al., 2013).

Nosso objetivo para este estudo foi a reprodução da superfície em nanoescala, previamente estudada por Mendonça et al. (2010) em discos de Ticp para avaliação dos eventos moleculares e não moleculares ligados a neoformação óssea na interface osso/implante *in vivo* em osso medular, visando avaliar o comportamento das células tronco mesenquimais.

A produção de nanoescala na superfície do biomaterial foi desenvolvida a partir dos estudos com o tecido ósseo. No osso encontram-se diferentes níveis de organização, da macroscópica até as pequenas estruturas a nível nano (Meirelles, 2010). As características nano são atribuídas aos constituintes da matriz óssea extracelular, que é principalmente formada por colágeno tipo I e cristais de hidroxiapatita, que formam a matriz orgânica e inorgânica respectivamente (Meirelles, 2010). A evolução das pesquisas concernente a esta avaliação permitiu progresso na área da implantodontia, avançando para a criação de estruturas na superfície dos implantes que mimetizassem as estruturas ósseas a nível nanométrico buscando melhorar o processo de osseointegração.

Atualmente sabe-se que superfície do implante exerce influencia na cascata de eventos celulares que sucedem a implantação. O primeiro evento pós implantação é adsorção de proteínas, no qual um perfil específico é atraído para a superfície do implante e isto depende das suas propriedades, as quais também influenciam a diferenciação das células tronco mesenquimais (CTM) em

osteoblastos para início da osseointegração (Bressan et al., 2013).

Diferentes métodos para a modificação da superfície já foram estudados e incluem tratamentos como jateamento com partículas titânia ou alumina e/ou ataque ácido. O jateamento foi a primeira modificação superficial aplicada clinicamente em implantes de titânio. Contudo, esta técnica foi aprimorada com a introdução do ataque ácido com soluções que incluem o ácido fluorídrico, sulfúrico, nítrico e clorídrico (Meirelles, 2010). Em nosso estudo, para a produção da nanoescala em implantes de Ticp, foi realizado um jateamento com partículas com 100 µm de $Al_2O_3$ e tratamento com imersão em 30% $H_2O_2$ e 2N $H_2SO_4$ (Mendonça et al., 2010). A mistura de $H_2SO_4$ / $H_2O_2$ tem sido usada para desoxidação e reoxidação controlada de metais e cria novas nanoestruturas amorfas de óxido de titânio na superfície do implante (de Oliveira, Nanci, 2004). Além disso, segundo Mendonça et al. (2010) o tratamento realizado com a mistura de peróxido e ácido ajuda a remover as partículas do jateamento de hidróxido de alumínio, aparar arestas deixadas pelo jateamento e resulta na produção da nanoescala.

Para averiguar a presença da nanoescala, nossos implantes foram avaliados por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nesta análise, observou-se a presença de nanoestrutura na superfície dos implantes de titânio, bem como notou-se diferenças evidentes entre as superfícies nano e lisa. Com relação a quantidade de células aderidas, verificou-se maior quantidade na superfície nano em todos os períodos avaliados.

Muitos autores já mostraram que as superfícies nanoestruturadas podem afetar positivamente o comportamento celular (Webster et al., 2000; de Oliveira, Nanci, 2004; Cooper et al., 2006; Nagasawa et al., 2016), conforme observado no presente estudo. No entanto, ainda faltam estudos mais completos que possam correlacionar dados de diferentes testes com o processo de neoformação óssea.

A expressão gênica dos genes inflamatórios e de formação óssea precoce e tardia está relacionada a cada etapa de diferenciação da linhagem celular óssea, sendo que a intensidade de cada marcador pode indicar quão ativa é a célula, o que idealmente poderia determinar a habilidade destas em formar osso na superfície (Meirelles, 2010), por isso avaliamos diferentes genes envolvidos na osseointegração.

O *RUNX2* e *OSX* são genes muito importantes envolvidos na diferenciação e função dos osteoblastos. O *RUNX2* é bem caracterizado como um regulador chave transcricional que é expresso em osteoblastos e desempenha múltiplas funções na osteogênese (Baek et al., 2009), incluindo a diferenciação das células tronco mesenquimais em pré osteoblastos (Komori et al., 1997; Tang et al., 2011). O *OSX* (osterix) é um importante fator de transcrição que é essencial na diferenciação de osteoblastos em osteoblastos funcionais (Baek et al., 2009; Tang, et al., 2011). A expressão do *OSX* é dependente do *RUNX2*, uma vez que acredita-se que o *OSX* funcione como um *downstream* do *RUNX2* na diferenciação dos osteoblastos. Segundo Nakashima et al. (2002) é necessário que a *RUNX2* esteja presente para que a expressão do *OSX* possa ocorrer.

Devido ao fato do *RUNX2* ser expresso no início do processo de diferenciação pequenas mudanças no seu nível de expressão já são suficientes para desencadear o processo de osteogênese. Nossos resultados mostraram que em ambas as superfícies o *Runx2* encontrava-se superexpresso, indicando que tanto a superfície lisa quanto a nano induzem a diferenciação das CTMcs em pré osteoblastos. Quando observamos os valores dos níveis de expressão gênica, o *Runx2* aos 7 dias apresentou-se 1,6 vezes mais expresso na superfície lisa quando comparada a nano; esta diferença é pouca quando avaliamos o *Osx*, onde também houve superexpressão do gene em ambas as superfícies aos 7 dias, porém os valores de expressão gênica foram 4 vezes maior na superfície nano do que na lisa. Estes resultados indicaram que a superfície nano foi muito mais

efetiva na diferenciação dos osteoblastos em osteoblastos maduros os quais posteriormente secretam matriz óssea. Existe um consenso entre os estudos que avaliam superfície com alterações em sua topografia a nível micro/nano, em que estas influenciam positivamente a expressão do *OSX* e *RUNX2*, tratando estes genes como fatores chaves de transcrição osteoindutivos (Guo et al., 2007; Mendonça et al., 2010; Thalji et al., 2014).

Outro gene que tem sido considerado um importante fator de transcrição é o *SATB2* (Dobreva et al., 2006). Existem evidências que este gene é um *downstream* do *OSX* e acredita-se que regule positivamente a sua expressão, sendo o *SATB2* o seu gene alvo direto (Tang et al., 2011). É possível inclusive que o *OSX* e *SATB2* dividam alguns genes *downstream* alvos da osseointegração; uma vez que foi relatado que ambos controlam a expressão do *BSP* (Thalji et al., 2013) por exemplo. A ausência da expressão de *Satb2* em camundongos mostrou múltiplos defeitos craniofaciais, incluindo um truncamento significativo da mandíbula, encurtamento dos ossos maxilofaciais orais e defeito na diferenciação osteoblástica (Dobreva et al., 2006). Tang et al. (2011) acreditam que este gene seja um regulador crítico da formação óssea.

Em nosso estudo o *Satb2* encontra-se superexpresso apenas na superfície em nanoescala dia 7. Atualmente poucos estudos reportaram o comportamento do *Satb2* nas superfícies em nanoescala. Thalji et al. (2013) mostrou em seu estudo *in vivo* comparando as respostas de diversos genes ligados a esqueletogênese, incluindo o *Satb2*, nas superfícies em micro e nanoescala, melhor resposta na expressão gênica deste gene na superfície nano após 4 dias de implantação, concluindo que este é capaz de modular uma maior e mais precoce resposta de reparação óssea. Portanto, quando reunimos os dados relacionados aos três fatores chaves de transcrição, podemos afirmar que a superfície nano exerce um papel positivo e superior a lisa no processo de diferenciação osteoblástica e consequentemente na osseointegração.

O potencial da superfície em promover a osseointegração é dependente da sua habilidade de induzir a diferenciação de células tronco mesenquimais pluripotentes ao longo de linhagem de osteoblastos e estimular a secreção de matriz por eles. Isto é orquestrado pelos fatores de transcrição supracitados (*RUNX2, OSX* e *SATB2*) que regulam a expressão de vários genes ósseos (Cooper, 1998) tais como *ALP, COL1, OCN, BSP* e *OPN* (Harada et al., 1999; Webster et al., 2000; Harada, Rodan, 2003; Tang et al., 2011).

Resumidamente, no processo de osteointegração a cascata de expressão gênica inicia-se com o *RUNX2* que age na diferenciação das células mesenquimais em pré osteoblastos (Bressan et al., 2013). O próximo passo é a diferenciação em osteoblastos maduros na qual o *OSX* exerce papel crítico (Bressan et al., 2013). Após a fase em que as células progenitoras encontram-se no estágio proliferativo, a mitose se encerra e as células começam as expressar outros genes como *ALP* (fosfatase alcalina) e *COL1* (colágeno tipo I), iniciando assim a produção e maturação da matriz extracelular osteogênica. Em seguida observa-se a expressão dos genes tardios envolvidos na mineralização extracelular, tais como a *BSP* (sialoproteína óssea), *OCN* (osteocalcina) e *DMP1* (Zhang et al., 2010; Bressan et al., 2013).

Com relação aos genes precoces de formação óssea, em nosso estudo quase todos apresentaram maior expressão na superfície em nanoescala, exceto a *Bmp2* que obteve baixa expressão para ambas as superfícies em todos os períodos avaliados e o *Prx1*, que é um gene também ligado a esqueletogênese (Chen et al., 2015) e mostrou um descontínuo padrão de expressão.

As *BMPs* são conhecidas por estimular as CTMs ou os osteoblastos progenitores a sofrer diferenciação osteogênica (Chen et al., 2015). Acredita-se também que expressão de *RUNX2* e *OSX* é regulada por uma ampla rede de sinalização incluindo membros da família das *BMPs* (Chen et al., 2015). A *BMP2* tem mostrado regular o *OSX* em células tronco mesenquimais (Tang et

al., 2011) e uma diminuição da atividade deste gene ocasionaria a diminuição e até mesmo ausência de expressão do *OSX* (Rose et al., 2009), fato não observado em nossos resultados. Outra importante função deste gene é a indução da atividade da *ALP* pelos osteoblastos (Omar et al., 2011; Lee et al., 2012; Pirraco et al., 2012). Não sabemos o porquê da baixa expressão da *Bmp2* no presente trabalho.

O exato papel do *PRX1* na osseointegração ainda tem sido estudado. Informações relativas a este gene são limitadas no osso, porque o nocaute global é letal devido a este gene também estar relacionado ao desenvolvimento de vasos cardíacos e pulmonares na embriogênese (Lu et al., 2015). Sabe-se no entanto que este gene é um regulador de desenvolvimento que parece ser silenciado após embriogênese. No entanto Lu et al. 2015 mostraram em seu estudo *in vitro* que este gene parece ser reativado pelo *Tnf-α* atuando na inibição de osteoblastogênese, uma vez que foi encontrado agindo na diminuição do *Osx* e *Runx2*, reduzindo portanto a diferenciação osteoblástica. Em nosso estudo, o *Prx1* encontra-se superexpresso em ambas as superfícies a partir do dia 3, no entanto, observamos que os níveis de expressão gênica para a superfície lisa foram maiores que na superfície nano aos 3 e 7 dias. Além disso, não houve um padrão constante de expressão na superfície lisa havendo brusca queda de expressão aos 5 dias. Enquanto que na superfície nano, o dia 5 mostrou melhores níveis de expressão gênica, com ligeira queda aos 7 dias. Para nós este gene não pareceu diminuir a diferenciação osteoblástica de forma direta, nem mesmo atuando na diminuição dos níveis de expressão do *Runx2* e *Osx*, como resultado direto encontrado por Lu et al. (2015).

A *ALP* é uma das proteínas precoces que regula a mineralização óssea e testes que avaliam a atividade da fosfatase alcalina são considerados um parâmetro primário indicativo da diferenciação celular em osteoblastos (Bryington et al., 2014). Este gene apresentou superexpressão apenas para a

superfície nano aos 7 dias, inclusive com diferenças estatísticas em relação ao grupo controle. O *COL1* é a mais abundante proteína do osso e é secretada durante os estágios precoces da diferenciação osteoblática, liga-se a *BSP* que inicia a mineralização da matriz (Bryington et al., 2014). Nossos resultados mostraram a superexpressão deste gene para as duas superfícies aos 7 dias, com a superfície nano apresentado melhores resultados que a lisa. Os resultados obtidos destes dois genes por si só nos permitiriam concluir que a superfície em nanoescala é mais ativa nos processos iniciais da osteogênese agindo de maneira mais efetiva na mineralização da matriz óssea.

Dos genes tardios avaliados neste estudo a maioria deles apresentou superexpressão, com melhores resultados na superfície nano, a partir do dia 5, exceto a *Ocn*, que mostrou expressão aos 7 dias. O *DMP1* é um gene muito expresso pelos osteócitos, sendo localizado em sua parede canalicular e lacunar, tendo efeito local na mineralização óssea e responde rapidamente a estimulação mecânica rápida (Harris et al., 2007). Quando avaliamos nossos resultados, observamos este padrão de comportamento onde há uma rápida expressão do *Dmp1*, o qual inicia-se após os eventos inflamatórios que procedem a implantação. A maior expressão para a superfície em nanoescala sugere que esta característica topográfica induz o aceleramento da diferenciação de osteoblastos em osteócitos, indicando presença de remodelação óssea, bem como biomineralização da matriz (Du et al., 2014). O *BSP* (sialoproteína óssea) é a maior proteína estrutural da matriz óssea e os osteoblastos totalmente diferenciados expressam esse gene, sendo o primeiro a ser detectado em osteoblastos diferenciados formando osso (Tang et al., 2011). Já *OCN* (osteocalcina) aparece com a mineralização que foi regulada somente em osteoblastos pós-proliferativos (Stein et al., 1996; Aubin,1998). Ambas são proteínas da matriz extracelular (Aubin, 1998). Os resultados obtidos nos permitiram afirmar que a superfície em nanoescala participa mais efetivamente

do processo de osseointegração, induzindo mais rápida mineralização óssea que a superfície lisa.

Uma vez implantado, os implantes cirúrgicos adsorvem proteínas e simultaneamente incitam uma resposta inflamatória de corpo estranho que começa com um resposta aguda e desenvolve-se como uma resposta crônica fibrótica que representa o primeiro passo para reparação tecidual (Anderson et al., 2008; Ma et al., 2014).

Os macrófagos são os primeiros a reconhecer o corpo estranho e secretar os mediadores inflamatórios para iniciar a inflamação (Jones et al., 2007). Macrógafos M1 secretam citocinas pró inflamatórias chave como, *IL-1β, NOS2* e *TNF-α* que promovem a inflamação, recrutamento dos neutrófilos, diferenciação osteogênica das CMTs assim como remodelação óssea. Enquanto os macrófagos M2 produzem mediadores anti-inflamatórios como a *ARG-1*e *IL-10* que promovem a resolução da inflamação e regeneração tecidual (Ma et al., 2014).

Após a cirurgia de implante a modulação do processo inflamatório, durante as fases precoces da cicatrização fornece um elemento chave para a fixação do implante. (Thalji et al., 2013). A rápida resolução fisiológica da inflamação é necessária para a cicatrização óssea, sendo assim é desejável que o aumento da expressão dos genes pró inflamação estejam apenas nos estágios iniciais da implantação e dos genes anti inflamatórios nos estágios finais, uma vez que a presença de citocinas pro e anti inflamatórias expressas ao mesmo tempo contribuem para um ambiente mal equilibrado, não permitindo adequada cicatrização da ferida (Eming et al., 2010). Em nosso estudo, observamos esse padrão de comportamento apenas para os genes pró inflamação *Tnf-α, Il-1β* e *Nos2* na superfície em nanoescala. Apesar de *Il-1β* apresentar queda da expressão em função do tempo, seu nível de expressão aos 7 dias apresentou-se acima do baseline, embora exista uma tendência a diminuição da expressão

deste gene com o tempo na superfície nano. Este mesmo gene apresentou padrão de expressão oposto na superfície lisa, com níveis de expressão gênica crescentes. O progressivo aumento da expressão da *IL-1β*, prolonga a fase inflamatória, retarda a cicatrização (Eming et al., 2010), atrapalhando a síntese de colágeno e impedindo a formação óssea (Ma et al., 2014). Na avaliação da resposta inflamatória, alguns estudos demonstram que a superfície em nanoescala parece regular melhor não só a expressão gênica osteogênica como também inflamatória (Bryington et al., 2014). Estes aspectos sugerem o aumento da osteogênese e consequentemente maior formação óssea (Thalji et al., 2014).

No presente trabalho diferentes testes foram conduzidos para confirmar os resultados obtidos na avaliação da expressão gênica. Uma análise adicional e eficiente para o estudo da expressão gênica é a citometria de fluxo. Esta técnica surgiu com a capacidade de incorporar de forma transitória ou estável um gene para uma proteína fluorescente expressável e detectá-la por meio de ferramentas como a citometria de fluxo (Telford et al., 2012). Neste estudo, a análise quantitativa por meio da citometria de fluxo das células provenientes do osso permitiu avaliar a presença da proteína bem como a expressão do gene *Osx*. Nesta análise, melhores resultados também mostraram-se para a superfície em nanoescala, com padrão crescente de quantificação do Osx em função do tempo, assim como observado na expressão gênica. Apesar de não haver diferenças estatísticas entre as amostras lisa e nano, o gene *Osx* estava superexpresso nas superfícies, com diferenças estatísticas na superfície nano aos 7 dias na avaliação pelo qPCR. A citometria de fluxo analisa cada célula individualmente para a presença da fluorescência. Já o PCR analisa as várias cópias do mRNA do gene de interesse. Isso explica porque não foi possível ver diferença estatisticamente significante em relação a citometria de fluxo, mas pelo qPCR houve esta diferença para o *Osx*.

A histologia tem sido utilizada como uma importante ferramenta de

avaliação de neoformação óssea na interface osso/implante em implantes com superfície em nanoescala (Karazisis et al., 2017; Fabbro et al., 2017; Karazisis et al., 2016). Nosso estudo permitiu uma análise mais completa e visual da neoformação óssea na interface osso/implante. Já a nanotomografia permitiu escaneamento do conjunto osso/implante para análise da osseointegração, sem a necessidade da remoção do implante e sem a utilização de coloração. Ambos os testes analisaram quantitativamente a neoformação óssea na interface osso/implante.

A avaliação das lâminas histológicas nos permitiu observar presença de osteoblastos cubóides em fileira margeando o tecido ósseo neoformado, apresentando citoplasma basófilo, bem como osteócitos aprisionados na matriz óssea. A presença dessas características apontam intensa atividade osteoblástica no processo de neoformação óssea. A quantificação de osso neoformado pelo programa Phase Expert mostrou diferenças estatísticas entre os grupos e períodos analisados. Os resultados apontaram a superfície nano aos 14 dias como a que apresentou maior quantidade de osso neoformado na interface do implante. Aos 7 dias também pudemos observar presença de osso neoformado em ambas superfícies, com melhores resultados para a superfície nano, mostrando neoformação óssea já nos primeiros dias pós implantação, o que no processo de osseointegração é extremamente desejável, já que sucesso clínico dos implantes está relacionado à rápida osseointegração (Le Guehenec et al., 2007). Com 21 dias provavelmente houve um dano no osso ao redor dos implantes durante o processamento para histologia com desmineralização e remoção do implante. É provável que grande parte do tecido mesmo desmineralizado estivesse aderido ao implante e foi dilacerado durante a remoção do implante. Esta teoria pode ser comprovada pelos resultados obtidos pelo nanoCT. A nanotomografia mostrou resultados melhores com diferenças estatísticas para a superfície nano aos 21 dias em relação a lisa e nano aos 14

dias, evidenciando um aumento progressivo da neoformação óssea nessa superfície, processo importante para estabelecimento da osseointegração e manutenção o implante. No presente estudo não foi possível a análise através de histologia de amostras não desmineralizadas e embutidas em resina.

A complexidade do processo de neoformação óssea, envolve uma série de eventos entre a formação óssea e a reabsorção pelos osteoclastos. No entanto, até o momento, a importância da presença dos osteoclastos no processo reabsorção óssea nas superfícies do implante não foi muito explorada. (Nagasawa et al., 2016). Sabe-se que a topografia de superfície dos implantes exercem influência no processo de osteoclastogênese (Nagasawa et al., 2016) e por isso este foi analisado em nosso estudo por meio da contagem de osteoclastos marcados pela TRAP.

Existem dois fatores de crescimento, M-CSF e RANK-L, que foram utilizados em nossos experimentos por promover a osteoclastogênese *in vitro* (Boyle et al., 2003). O M-CSF é essencial nos processos iniciais da osteoclastogênese, uma vez que aumenta a sobrevivência dos osteoclastos (Buijs, van der Pluijm, 2009) estando envolvido na formação, desenvolvimento e função destes (Fixe et al., 1997; Pixley, Stanley, 2004; Makrigiannakis et al., 2006; Wada et al., 2006; Chitu, Stanley, 2006). Já o RANK-L é importante neste processo, pois promove a diferenciação e a ativação osteoclástica através da ligação ao seu receptor RANK, na superfície dos precursores osteoclásticos (Burgess et al.,1999). Esta interação promove a fusão e ativação dos precursores dos osteoclastos, além de estimular a expressão de vários marcadores osteoclásticos como a TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) (Boyle et al., 2003; Boyce, Xing 2008) que é produzida abundantemente pelos osteoclastos e um potencial marcador para a reabsorção óssea (Halleen et al., 1996, 2000).

Segundo Nagasawa et al. (2016) a osteoclastogênese pode desempenhar um papel no processo osteointegração de duas maneiras. Nos estágios iniciais

inflamatórios, após a colocação do implante, na remoção, mediada por osteoclastos, do osso necrótico na interface e durante a fase formativa da osseointegração, onde irá ajudar a regular o processo de formação e reabsorção óssea, evitando assim um acúmulo de massa óssea. Diante disso, nossos resultados evidenciaram que a superfície lisa mostrou maior atividade osteoclástica nos estágios iniciais da osseointegração, tendo portanto melhor resposta na reparação da inflamação e a nanoescala revelou número de osteoclastos mais proeminente nos estágios mais tardios, mostrando inclusive diferenças estatísticas, indicando que esta superfície ativa mais células osteoclásticas no estágio de remodelação óssea.

# 6 CONCLUSÃO

Concluímos, portanto que a superfície em nanoescala modula uma melhor e mais rápida resposta de reparo ósseo e inflamatório, como revelado pela expressão gênica.. A avaliação da neoformação óssea realizada pelos testes quantitativos, também confirmaram e respaldaram os resultados da expressão gênica, mostrando que a superfície em nanoescala possui propriedades osteocondutivas e melhoram os eventos biológicos que ocorrem na interface osso/implante, contribuindo para melhorar o processo de osseointegração.

# REFERÊNCIAS*

Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. Semin Immunol. 2008 Apr;20(2):86-100.

Aubin JE. Bone steam cells. J Cell Biochem Suppl. 1998;30-31:73-82.

Baek WY, Lee MA, Jun JW, Kim SY, Akiyama H, de Crombrugghe B, et al. Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix J Bone Miner Res. 2009 Jun;24(6):1055-65.

Bressan E, Sbricoli L, Guazzo R, Tocco I, Roman M, Vindigni V, et al. Nanostructured surfaces of dental implants. Int J Mol Sci. 2013 Jan 17;14(1):1918-31.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. Arch Biochem Biophys. 2008 May 15;473(2):139-46.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. "Osteoclast differentiation and activation." Nature. 2003; (6937):337-42.

Bryington M, Mendonça G, Nares S, Cooper LF. Osteoblastic and cytokine gene expression of implant-adherent cells in humans. Clin Oral Implants Res. 2014 Jan;25(1):52-8.

Buijs JT, van der Pluijm G. Osteotropic cancers: from primary tumor to bone. Cancer Lett. 2009 Jan 18;273(2):177-93.

Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring D, Van G, Capparelli C , et al.The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. J Cell Biol. 1999 ay 3;145(3):527-38.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

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 Sep;8(9):3516-23.

Chen Q, Sinha K, Deng JM, Yasuda H, Khare R, Behringer RR, et al. Mesenchymal Deletion of Histone demethylase NO66 in mice promotes bone formation. J Bone Miner Res. 2015 Sep;30(9):1608-17.

Clark P. Cell behaviour on micropatterned surfaces. Biosens Bioeletron. 1994;(9): 657-661.

Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. Curr Opin Immunol. 2006 Feb;18(1):39-48.

Christenson EM, Anseth KS, van den Beucken JJ, Chan CK, Ercan B, Jansen JA, et al. Nanobiomaterial applications in orthopedics. J Orthop Res. 2007 Jan;25(1):11-22.

Cooper LF. Biologic determinants of bone formation for osseointegration: Clues for future clinical improvements. J Prosthet Dent. 1998 Oct;80(4):439-49.

Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmén A, et al.Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO2 grit-blasted c.p. titanium endosseous implants Biomaterials. 2006 Feb;27(6):926-36.

Damião BM. Nanotecnologia em implantodontia: tendências atuais [monografia]. [Internet] Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia, 2011. [acesso em 2017 Mar 10]. Disponível em: http/bibliotecadigital.ufmg.br/dsspace/bitstream/ handle/1843/BUBD-956M8J/monografia_breno_dami_o.pdf?sequence=1

De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. Biomaterials. 2004 Feb;25(3):403-13.

Dobreva G, Chahrour M, Dautzenberg M, Chirivella L, Kanzler B, Farinas I, et al. SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. Cell. 2006 Jun 2;125(5):971-86.

Du Z, Ivanovski S, Hamlet SM, Feng JQ, Xiao Y. The ultrastructural relationship between osteocytes and dental implants following osseointegration. Clin Implant Dent Relat Res. 2016 Apr;18(2):270-80

Fabro MD, Taschieri S, Canciani E, Addis A, Musto F, Weinstein R, et al. Osseointegration of titanium implants with different rough surfaces: A histologic and histomorphometric study in an adult minipig model. Implant Dent. 2017(3):357-366.

Fixe P, Rougier F, Ostyn E, Gachard N, Faucher J L, Praloran V, et al. Spontaneous and inducible production of macrophage colony-stimulating factor by human bone marrow stromal cells. Eur Cytokine Netw. 1997 Mar;8(1):91-5.

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 Dec;28(36):5418-25.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. Nature. 2003 May 15;423(6937):349-55.

Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A. Cbfa1 Isoforms Exert Functional Differences in Osteoblast Differentiation. J Biol Chem. 1999 Mar 12;274(11):6972-8.

Halleen JM, Hentunen TA, Hellman J, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase from human bone: purification and development of an immunoassay. J Bone Miner Res. 1996 Oct;11(10):1444-52.

Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. J Bone Miner Res. 2000 Jul;15(7):1337-45.

Harris SE, Gluhak-Heinrich J, Harris MA, Yang W, Bonewald LF, Riha D. DMP1 and MEPE expression are elevated in osteocytes after mechanical loading in vivo: Theoretical role in controlling mineral quality in the perilacunar matrix. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2007 Oct-Dec;7(4):313-5.

He J, Zhou W, Zhou X, Zhong X, Zhang X, Wan P, et al. The anatase phase of nanotopography titania plays an important role on osteoblast cell morphology and proliferation. J Mater Sci Mater Med. 2008 Nov;19(11):3465-72.

Ito Y. Surface micropatterning to regulate cell functions. Biomaterials. 1999 Dec;20(23-24):2333-42.

Jones JA, Chang DT, Meyerson H, Colton E, Kwon IK, Matsuda T, et al. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. J Biomed Mater Res A. 2007 Dec 1;83(3):585-96.

Karazisis D, Ballo AM, Petronis S, Agheli H, Emanuelsson L, Thomsen P et al. The role of well defined nanotopography of titanium implants on osseointegration: cellular and molecular events in vivo. Int J Nanomedicine. 2016 Apr 1;11:1367-82.

Karazisis D, Petronis S, Agheli H, Emanuelsson L, Norlindh B, Johansson A, et al. The influence of controlled surface nanotopography on the early biological events of osseointegration. Acta Biomater. 2017 Apr 15;53:559-571.

Khang D, Lu J, Yao CH, Haberstroh KM, Webster TJ. The role of nanometer and sub-micron surfacefeatures on vascular and bone cell adhesion on titanium. Biomaterials. 2008 Mar;29(8):970-83.

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 May 30;89(5):755-6.

Kulkarni M, Mazare A, Gongadze E, Perutkova Š, Kralj-Iglič V, Milošev I, et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. Nanotechnology. 2015 Feb 13;26(6):062002.

Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. Dent Mater. 2007 Jul;23(7):844-54.

Liu XY, Chu PK, Ding CX. Surface nano-functionalization of biomaterials. Mater Sci Eng R-Reports. 2010;70:275–302.

Lu X, Beck GR Jr, Gilbert LC, Camalier CE, Bateman NW, Hood BL, et al. Identification of the homeobox protein Prx1 (MHox, Prrx-1) as a regulator of osterix expression and mediator of tumor necrosis factor a action in osteoblast differentiation. J Bone Miner Res. 2011 Jan;26(1):209-19.

Ma QL, Zhao LZ, Liu RR, Jin BQ, Song W, Wang Y. Improved implant osseointegration of a nanostructured titanium surface via mediation of macrophage polarization. Biomaterials. 2014 Dec;35(37):853-867.

Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou S N, Nikas G, Chrousos G P. Hormonal and cytokine regulation of early implantation. Trends Endocrinol Metab. 2006 Jul;17(5):178-85.

Masuda T, Salvi GE, Offenbacher S, Felton DA, Cooper LF. Cell and matrix reactions at titanium implants in surgically prepared rat tibiae. Int J Oral Maxillofac Implants. 1997 Jul-Aug;12(4):472-85.

Meirelles L. Nanoestruturas e a resposta óssea.Uma alternativa segura para a reabilitação com implantes osseointegráveis. Revista Implant News. 2010 Mar;7(2):169-72.

Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. Biomaterials. 2007 Nov;28(32):4748-55.

Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. The combination of micron and nanotopography by H2SO4/H2O2 treatment and its effects on osteoblast-specific gene expression of hMSCs. J Biomed Mater Res A. 2010 Jul;94(1):169-79.

Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology – From micron to nanotopography.
Biomaterials. 2008(28):3822-35.

Meyer U, Joos U, Mythili J, Stamm T, Hohoff A, Fillies T, et al. Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. Biomaterials. 2004 May;25(10):1959-67.

Nagasawa M, Cooper LF, Ogino Y, Mendonca D, Liang R, Yang S, et al. Topography Influences Adherent Cell Regulation of Osteoclastogenesis. J Dent Res. 2016 Mar;95(3):319-26.

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

Pixley FJ, Stanley ER. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. Trends Cell Biol. 2004 Nov;14(11):628-38.

Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. J Biomed Mater Res A. 2004 Jul 1;70(1):129-38.

Stanford CM. Surface modifications of dental implants. Aust Dent J. 2008 Jun;53 Suppl 1:S26-33.

Suchaneka J, Soukupb T, Visekb B, Ivancakovaa R, Kucerovac L, Mokryb J. Dental pulp stem cells and their characterization. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2009;(153):31–6.

Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Frenkel B, Montecino M. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editores. Principles of bone biology. San Diego, CA: Academic Press, (1996). p. 69–86.

Tang W, Li Y, Osimiri L, Zhang C. Osteoblast-specific transcription factor Osterix (Osx) is an upstream regulator of Satb2 during bone formation. J Biol Chem. 2011 Sep 23;286(38):32995-3002.

Thalji G, Gretzer C, Cooper LF. Comparative molecular assessment of early osseointegration in implant-adherent cells. Bone. 2013 Jan;52(1):444-53.

Thalji G, Cooper LF. Molecular assessment of osseointegration in vitro: a review of current literature. Int J Oral Maxillofac Implants. 2014 (2):e171-99.

Telford WG, Hawley T, Subach F, Verkhusha V, Hawley RG. Flow cytometry of fluorescent proteins. Methods. 2012 Jul;57(3):318-30.

Vandrokava M, Bacakova L. Adhesion growth and differentiation of osteoblasts on surface modified material developed for bone implants. Physiol Res. 2011;60(3):403-17.

Variola F, Yi JH, Richert L, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. Biomaterials. 2008 Apr;29(10):1285-98.

Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. Biomaterials. 2000 Sep;21(17):1803-10

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med. 2006 Jan;12(1):17-25.

Yin C, Zhang Y, Cai Q, Li B, Yang H, Wang H, et al. Effects of the micro–nano surface topography of titanium alloy on the biological responses of osteoblast. J Biomed Mater Res A. 2017 Mar;105(3):757-69.

# **ANEXO A**- Comitê de ética em pesquisa com animais

**Principal Investigator:** Gustavo Mendonca
**Protocol:** PRO00006203
**Protocol Title:** miRNA Modulation of Osteoblast Differentiation on Nanoscale Titanium Surfaces
**Approval Period:** 5/11/2015 - 5/11/2018

The University Committee on Use and Care of Animals (UCUCA) has reviewed your application to use vertebrate animals referenced below. This project has been approved. The proposed animal use procedures are in compliance with University guidelines, State and Federal regulations, and the standards of the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals."

There may be additional issues that need to be addressed prior to initiation of the associated research. It is your responsibility, as Principal Investigator, to secure all the necessary requirements and recommendations (e.g., IBC approval, Animal Use training, accepting OSEH Findings and Recommendations).

When communicating with the UCUCA Office please refer to protocol PRO00006203 .

The approval date is 5/11/2015 . The approval period is for three years from this date. However, the United States Department of Agriculture (USDA) requires an annual review of protocols to use animals. Therefore, each year of this protocol prior to the anniversary of its approval date, you will be notified via email to submit a short annual review. Your continued animal use approval is contingent upon the completion and return of this annual review.

You will also be notified prior to expiration so that your renewal application can be prepared, submitted and reviewed in a timely manner to avoid noncompliance. For any change to the study, an amendment must be submitted to the UCUCA for review and approval prior to the implementation of the proposed change.

The University's Animal Welfare Assurance Number with the NIH Office Of Laboratory Animal Welfare (OLAW) is A3114-01, and most recent date of accreditation by the Association For The Assessment And Accreditation Of Laboratory Animal Care International (AAALAC, Intl.) is November 6, 2009.

If you receive news media inquiries concerning any aspect of animal care or use in this project, please contact James Erickson, News and Information Services, 647-1842. If you have security concerns regarding the animals or animal facilities, contact Bill Bess, Director of Public Safety, 763-3434.

A formal approval letter will follow for each funding source listed on the protocol.

Sincerely,

Dr. Daniel D. Myers, DVM, MPH
Associate Professor and Chairperson
University Committee on Use and Care of Animals