

AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA VIABILIDADE, ADESÃO E SÍNTESE DE CITOCINAS EM OSTEOBLASTOS HUMANOS CULTIVADOS SOBRE DIFERENTES SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

FERNANDA FARIA RESENDE¹, NATÁSSIA CRISTINA MARTINS OLIVEIRA², CAMILLA CHRISTIAN GOMES MOURA³, DARCENY ZANETTA BARBOSA⁴, PAULA DECHICHI⁵

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar *in vitro* o efeito de três superfícies de titânio disponíveis comercialmente: usinada (USI), ataque ácido (AA) e bioanodizada com CaP (BIO), sobre a viabilidade e adesão celulares, bem como sobre a secreção das interleucinas IL-1 β e IL-12 por osteoblastos hFOB 1.19. A viabilidade foi determinada pelo método colorimétrico MTT-Formazan após 1, 7 e 14 dias de cultura. Nos períodos de 7 e 14 dias, a adesão celular foi avaliada por meio da contagem de núcleos marcados por Hoechst ao microscópio confocal. Os sobrenadantes de 1, 7 e 14 dias de cultivo foram submetidos ao teste ELISA Sanduíche para dosagem de IL-1 β e IL-12. Após 1 dia de cultura, USI apresentou maior número de células viáveis, sendo estatisticamente diferente apenas do grupo AA ($p < 0,001$). Após 7 dias, houve aumento significativo na viabilidade para AA e BIO quando comparados a USI ($p = 0,047$ e $p = 0,003$, respectivamente), o que não permaneceu aos 14 dias, período no qual nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre os grupos avaliados. Mesmo não tendo a maior viabilidade após 7 e 14 dias de cultura quando comparada às outras superfícies, USI apresentou significativo aumento no número de células aderidas ($p < 0,05$). A secreção de IL-1 β e IL-12 não foi afetada pelo tratamento de superfície nem pelo tempo experimental. As superfícies usinadas influenciaram positivamente os eventos iniciais da neo-osteogênese *in vitro*, como viabilidade e adesão celulares, não desencadeando uma produção exacerbada de citocinas envolvidas com a remodelação óssea e a inflamação.

Palavras-chave: Superfície de implante, Osseointegração, Cultura de células.

¹ Graduanda da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, Bolsista de Iniciação Científica FAPEMIG BIO 016/2011; fezinhafr_1@hotmail.com

² Mestre em Clínica Odontológica Integrada pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia; natassia.oliveira@outlook.com

³ Professora Doutora do Departamento de Biologia Estrutural (Histologia) do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro; camilla@icbn.uftm.edu.br

⁴ Professor Doutor do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia; zanetta@foufu.ufu.br

⁵ Professora Doutora do Departamento de Morfologia (Histologia) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia; pauladechichi@umuarama.ufu.br

IN VITRO EVALUATION OF THE VIABILITY, ADHESION AND CYTOKINES PRODUCTION OF HUMAN OSTEOBLASTS CULTURED ON DIFFERENT TITANIUM SURFACES

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze *in vitro* the effect of three commercially available titanium surfaces: machined (USI), acid etching (AA), and anodization with CaP (BIO), on cellular viability and adhesion, as well as on the secretion of IL-1 β and IL-12 by hFOB 1.19 osteoblastic cell line. The viability was determined by MTT-Formazan assay after 1, 7, and 14 days of cell culture. At 7 and 14 days, the proliferation was evaluated by counting cell nuclei stained by Hoescht at confocal microscope. The supernatants from 1, 7 and 14 days were submitted to the Sandwich ELISA test for measurement of IL-1 β and IL-12 levels. After 1 day of cell culture, USI showed a higher number of viable cells than the other groups but statistically different only from AA ($p < 0.001$). At 7 days, there was a significant increase in cell viability for AA and BIO when compared to USI ($p = 0.047$ and $p = 0.003$, respectively), what did not happen after 14 days, which no significant difference was observed among the evaluated groups. Even though USI did not show significant high viability at 7 and 14 days when compared to other surfaces, it presented the highest number of adhered cells ($p < 0.05$) at these periods. The secretion of IL-1 β and IL-12 was affected neither by surface treatment nor by experimental time. The machined surfaces positively influenced the early events of neo-osteogenesis *in vitro*, such as cell adhesion and viability, not triggering an exacerbated production of cytokines involved in bone remodeling and inflammation.

Keywords: Implant surface, Osseointegration, Cell culture.

1. INTRODUÇÃO

O procedimento cirúrgico para instalação de implantes envolve uma cascata de eventos biológicos que culminam na conexão direta entre tecido ósseo e implante de titânio sem interposição de tecidos moles, ou seja, na osseointegração (FRANCISCHONE e MENUCCI-NETO, 2009). Mas, para que a osseointegração ocorra, deve haver um balanço entre vários aspectos vasculares, humorais e celulares da inflamação (REFAI et al., 2004),

bem como de eventos iniciais relacionados à neo-osteogênese, como viabilidade, adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos (LAVENUS et al., 2010). Esse balanço é influenciado pela biocompatibilidade do material, pelo desenho e a superfície do implante, pela qualidade do leito ósseo receptor, pela técnica cirúrgica e pelas condições de carga (FRANCISCHONE e MENUCCI-NETO, 2009). Dentre estes fatores, a superfície do implante, por estar em íntimo contato com os tecidos biológicos na área de implantação, torna-se um fator determinante na sua biocompatibilidade e no processo de osseointegração (NANCI et al. 1998).

Desta maneira, diversas modificações das superfícies de implante têm sido desenvolvidas, ou por alteração na topografia ou por alteração na composição química, ou por ambos (ENHENFEST et al., 2010). Essas alterações têm como objetivo acelerar o processo de reparo ósseo e melhorar a ancoragem óssea, principalmente em situações de quantidade e qualidade ósseas ruins (FRIBERG et al., 2000). As modificações físicas na topografia das superfícies compreendem alterações na morfologia e rugosidade das mesmas, tanto em escala micrométrica quanto nanométrica. Já as modificações químicas, compreendem a incorporação de moléculas inorgânicas à superfície (como as diversas fases de cálcio fosfato), ou moléculas orgânicas (peptídeos, enzimas, proteínas e fatores de crescimento) (SCHLIEPHAKE E SCHARNWEBER, 2008; ENHENFEST et al., 2010).

O ponto de partida das superfícies de implante foram as superfícies usinadas. Comercialmente, elas são conhecidas como superfícies lisas, mas apresentam micro-ranhuradas resultantes do próprio processo de torneamento do metal. Apesar de terem sido utilizadas como padrão ouro por décadas na implantodontia, inclusive constituindo referência como controle em estudos de novas superfícies, eram necessários vários meses para a osseointegração do implante, de acordo com protocolos clássicos (COELHO et al., 2009).

Atualmente tem sido demonstrado que a modificação no padrão de rugosidade da superfície aumenta não somente o contato osso-implante, mas também a interação biomecânica da interface em curtos períodos depois da implantação, acelerando o processo de osseointegração (BUSER et al., 2004; ELIAS et al., 2008a; ROCCI et al., 2008; BONFANTE et al., 2011). Por isso, as superfícies rugosas (sejam micro ou nanotexturizadas) têm se difundido na implantodontia oral e substituído frequentemente os implantes com superfícies usinadas nas aplicações clínicas (SCHLIEPHAKE et al., 2005).

Neste sentido, emergiram diversas técnicas de modificação física, algumas das quais ainda se encontram disponíveis comercialmente, como: o plasma spray de titânio (também conhecida como TPS – Titanium Plasma Spray); o jateamento com sílica, alumina (Al_2O_3),

dióxido de titânio (TiO_2) ou biocerâmica reabsorvível (RBM – Resorbable Blast Media) seguidos ou não pelo ataque ácido; e o ataque ácido propriamente dito, que se utiliza da imersão em apenas um ácido ou em uma combinação de ácidos fortes (clorídrico, fluorídrico, nítrico e sulfúrico) (COELHO et al., 2009). Com exceção do primeiro tipo de tratamento citado, que caiu em desuso devido a possibilidade de delaminação das partículas durante instalação ou carregamento funcional (LE GUÉHENNEC et al., 2007), existe uma variedade de morfologias topográficas assumidas tanto para o jateamento quanto para o ataque ácido, dependendo das condições nas quais os tratamentos são realizados (LE GUÉHENNEC et al., 2007; COELHO et al., 2009).

Até o presente, muitas investigações experimentais têm demonstrado claramente que a resposta do tecido ósseo é influenciada pela topografia da superfície do implante (TOMSIA et al., 2010; GITTENS et al., 2011). As superfícies com ataque ácido, assim como os implantes jateados, demonstram melhor osseointegração comparadas às usinadas (WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2009; BONFANTE et al., 2011). Além disso, estudos mais recentes têm sugerido que modificações químicas na superfície do titânio usando moléculas bioativas melhoram e/ou aceleram o processo de diferenciação osteoblástica (LINCKS et al., 1998; BUSER et al., 2004; LIU et al., 2007). Como as moléculas são integradas na estrutura do implante, elas são liberadas gradualmente, agindo como um sistema lento de liberação de agentes osteogênicos no sítio de implantação (LIU et al., 2004).

Dentre todas as modificações químicas de superfície de implante, a cobertura com diferentes fases de fosfato de cálcio (CaP), principalmente hidroxiapatita (HA), tem recebido significativa atenção (YANG et al., 2005). O interesse em usar esse material é devido à sua similaridade química com a matriz óssea mineralizada e pelo fato de que essas coberturas podem ser aplicadas ao longo da superfície do implante por diferentes métodos industriais (COELHO et al., 2009). A biocobertura de CaP aumenta a osteocondutividade dos implantes (BARRÈRE et al., 1999), além de serem biocompatíveis, não tóxicas e capazes de formar uma união bioquímica com o tecido ósseo, conhecida como “bone-bonding” (MENDES et al., 2007).

Coberturas com CaP ou HA podem ser obtidas por diferentes métodos: plasma spray, deposição por pulverização catódica, deposição sol-gel, deposição a laser pulsado, deposição assistida de feixe iônico (DAFI), deposição cristalina discreta (DCD), deposição eletroquímica (também conhecida como anodização ou oxidação anódica), deposição eletroforética, tratamento hidrotérmico e precipitação biomimética (NARAYANAN et al., 2008). Dentre eles, a cobertura biocerâmica mais disponível comercialmente é a obtida por

plasma spray de hidroxiapatita (PSHA). Entretanto, a possibilidade de delaminação da cobertura a partir da superfície de titânio e falha adesiva na interface biocerâmica-substrato metálico, fez com que esse tratamento caísse em desuso na prática odontológica (COELHO et al., 2009).

Apesar da grande variedade de tratamentos de superfície que são atualmente propostos pela comunidade científica, ainda não há um consenso sobre qual seria o melhor tratamento para acelerar a resposta biológica e alcançar um melhor reparo ósseo (DOS SANTOS et al., 2009). Métodos capazes de produzir superfícies micro-rugosas, como jateamento, ataque ácido e anodização eletroquímica, continuam a ser usados pela indústria de implante para confeccionar superfícies de implantes dentais (ELIAS et al., 2008a; ELIAS et al., 2008b; DOS SANTOS et al., 2009). Assim é importante que essas superfícies comercialmente disponíveis continuem a ser avaliadas para determinar os efeitos das características de superfície sobre o comportamento celular e o reparo ósseo e, ainda, sobre a inflamação, evento crucial para determinar se o reparo caminhará para formar tecido ósseo (sucesso) ou tecido mole (falha).

Estudos *in vitro*, tais como modelos de cultura de células, são rotineiramente utilizados para avaliar a resposta de osteoblastos em contato com diferentes substratos de implantação no tecido ósseo (MOURA et al., 2009; GITTENS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013). As culturas de células geralmente focam no aspecto morfológico, na viabilidade, adesão, proliferação e diferenciação dos osteoblastos frente a implantes com diversos tratamentos de superfície (ANSELME et al., 2000; COELHO et al., 2009). No entanto, para o desenvolvimento ósseo fisiológico, além da necessidade de ocorrer esses eventos celulares iniciais, os osteoblastos devem sinalizar, de maneira controlada e coordenada, para que ocorra a reabsorção óssea (SPYROU et al., 2002): ou por ativação dos osteoclastos ou pelo estímulo à proliferação de células progenitoras de osteoclastos (LERNER, 2000). Esta sinalização é amplamente mediada por interleucinas assim como por outras moléculas, como a osteoprotegerina (OPG) (SPYROU et al., 2002).

A maioria dos estudos que relacionam diferentes tratamentos de superfícies à síntese de citocinas e interleucinas focam na maneira como mediadores pró e anti-inflamatórios secretados por células inflamatórias (e não osteoblastos) influenciariam na magnitude e duração da reação inflamatória, desencadeada após a injúria causada pela instalação de um implante (REFAI et al., 2004; GÖRANSSON et al., 2006; OMAR et al., 2010; OMAR et al., 2011; MOURA et al., 2011). Poucas são as pesquisas (SPYROU et al., 2002) sobre a influência dos tratamentos de superfície na sinalização para remodelação *in vitro*, via secreção de interleucinas pelos próprios osteoblastos. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi

analisar *in vitro* o efeito de três superfícies de titânio disponíveis comercialmente, usinada, ataque ácido e bioanodizada com CaP, sobre a viabilidade e adesão celulares, bem como sobre a secreção de interleucinas (IL-1 β e IL-12) por osteoblastos fetais humanos imortalizados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e caracterização dos discos de titânio

Os discos de titânio utilizados nesta pesquisa foram produzidos, embalados e gentilmente doados pela empresa Conexão Sistemas de Prótese (Arujá, SP, Brasil). Os espécimes (n=6 discos/grupo) foram construídos em titânio comercialmente puro, com 8 mm de diâmetro e 4 mm de altura, os quais receberam três tipos de tratamentos de superfície: usinado (USI) – controle de heterogeneidade, ataque ácido (AA) e bioanodizado com incorporação de CaP (BIO) (Fig.1). Os discos USI foram obtidos a partir do torneamento de barras de titânio e não receberam qualquer tratamento adicional que possibilitasse a modificação da textura ou composição química do metal. Os discos tratados com ácido foram imersos em uma mistura contendo ácido nítrico (HNO₃), clorídrico (HCl) e sulfúrico (H₂SO₄), o que resultou em superfícies com rugosidade superficial em torno de 0,67 μ m. As amostras bioanodizadas foram preparadas pelo método de oxidação anódica a microarco em solução eletrolítica contendo Ca e P sob altas tensões, no modo galvanostático, resultando em superfícies com rugosidade superficial em torno de 0,87 μ m (ELIAS, 2010). A rugosidade, molhabilidade, morfologia e composição dessas superfícies foram previamente determinadas utilizando rugosímetro a laser, goniômetro, microscópio eletrônico de varredura (MEV) e espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS), respectivamente (ELIAS et al., 2008b).

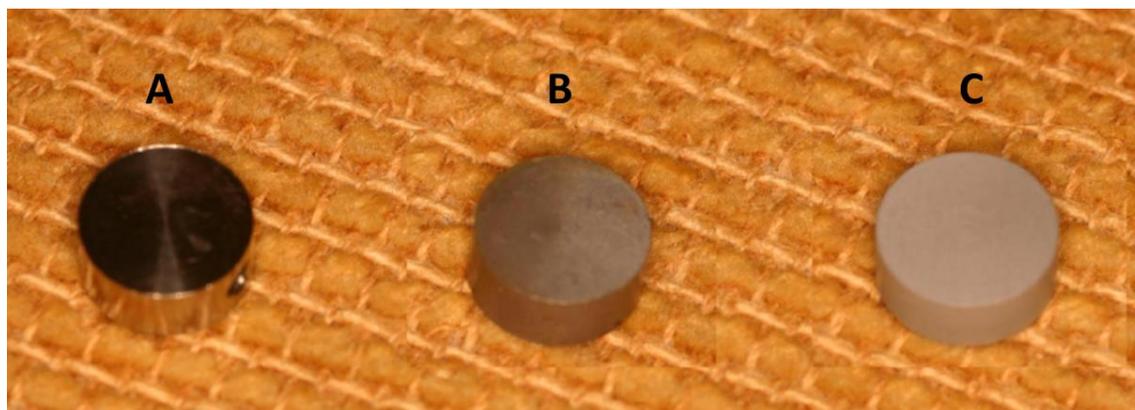


Fig.1: Discos de titânio com diferentes tratamentos de superfície: A- usinado (USI), B- ataque ácido (AA) e C- bioanodizado com CaP (BIO).

2.2 Cultura dos osteoblastos

Osteoblastos fetais humanos da linhagem hFOB 1.19 (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) foram cultivados em placas de petri estéreis contendo uma mistura de 1:1 de meio Eagle modificado por Dulbecco (alta glicose) e Hams F12 (DMEM/F12) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementada com 10% de soro fetal bovino (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina) (Invitrogen). As culturas foram mantidas em estufa umidificadora a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de ar até atingirem confluência.

Para que o plaqueamento fosse realizado, as células foram soltas do fundo da placa por descolamento enzimático com solução de tripsina e EDTA por 5 minutos a 37°C. Após este tempo, as células desprendidas foram coletadas e a ação proteolítica da tripsina foi inibida pela adição de soro fetal bovino à suspensão. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 1500rpm, a 22°C e o “pellet” obtido foi ressuspensionado em DMEM/F12. As células foram contadas em hemocitômetro e plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/poço sobre os discos de titânio em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). Cada poço foi completado com 1 mL de meio, sendo que a cada três dias o mesmo era trocado e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase.

Após 1, 7 e 14 dias de cultura, os sobrenadantes foram coletados para dosagem das citocinas IL-1 β e IL-12. Nos mesmos tempos experimentais, foi avaliada a viabilidade dos osteoblastos. A adesão celular foi analisada após 7 e 14 dias de cultura.

2.3 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico MTT-Formazan, que testa a atividade de uma enzima mitocondrial em células viáveis. Essa enzima, chamada lactato desidrogenase, é capaz de clivar o MTT, o que demonstra então a integridade e atividade da mitocôndria e, por consequência, a viabilidade celular. De cada poço, 600 μ L de meio de cultura foram aspirados e armazenados a -70 °C até a utilização, restando 400 μ L. A atividade enzimática foi determinada adicionando 40 μ L/poço de MTT (M-2128, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), na concentração de 5 mg/ml, seguida de incubação das placas a

37 °C por 4 h. Após o período de incubação, os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos com 400 µL/poço de dimetil sulfoxido (DMSO, Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Em seguida, o conteúdo de cada poço foi homogeneizado utilizando um micropipetador e uma alíquota de 100 µL de cada um foi transferida para poços separados em uma placa de 96 poços (Corning Incorporated). A viabilidade celular foi então medida como absorbância em leitor de microplacas a 570 nm (Instrutherm Espectrofotômetro UV-2000A, São Paulo, SP, Brasil). A densidade óptica de cada poço foi proporcional à quantidade de cor que por sua vez era proporcional ao número de células viáveis. Para todos os tempos experimentais, os testes foram realizados em triplicata.

2.4 Determinação da adesão celular

A avaliação da adesão celular foi realizada por meio da contagem dos núcleos marcados com Hoechst Dye H33258 (Invitrogen), um marcador específico de DNA. O meio de cultura foi removido de cada poço e as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas. Posteriormente, os discos contendo as células aderidas foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato a 1% (PBS 1x) por 3 minutos cada. Então, foi adicionado aos poços, 1 ml de PGN, solução composta por PBS 1x, 0,25% de gelatina em pó (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e 0,1% de azida sódica (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos. Em seguida, as células cultivadas sobre os discos foram permeabilizados com Triton 1% por 15 minutos e, na sequência, lavadas com PBS 1x por 3 minutos. O PBS foi retirado e o Hoechst Dye H 33258 diluído em uma solução de PGN mais 0,1% de saponina, na concentração de 1:1000µl. Foram adicionados 10 µl da solução contendo Hoechst sobre cada disco e deixados por 5 minutos. Na sequência, os discos foram lavados novamente duas vezes com PBS 1x, por 30 segundos cada. A montagem dos discos sobre as lâminas foi feita com adesivo a base de cianoacrilato (Super Bonder[®], Loctite, São Bernardo dos Campos, São Paulo, Brasil) de um lado do disco e lamínulas com uma gota de reagente antidecaimento (Prolong[®] Gold Antifade Reagent, Invitrogen) do outro. As lâminas foram analisadas ao microscópio confocal (Zeiss 510 Meta, Carl Zeiss, Stuttgart, Alemanha) acoplado com câmera digital Motic Cam (Motic, Richmond, BC, Canadá). Com auxílio do software Motic Image Plus 2.0 ML, dezenove campos em cada disco foram fotografados para posterior contagem das células aderidas (núcleos marcados com Hoechst) (Fig.2) no software Adobe Photoshop CS5.

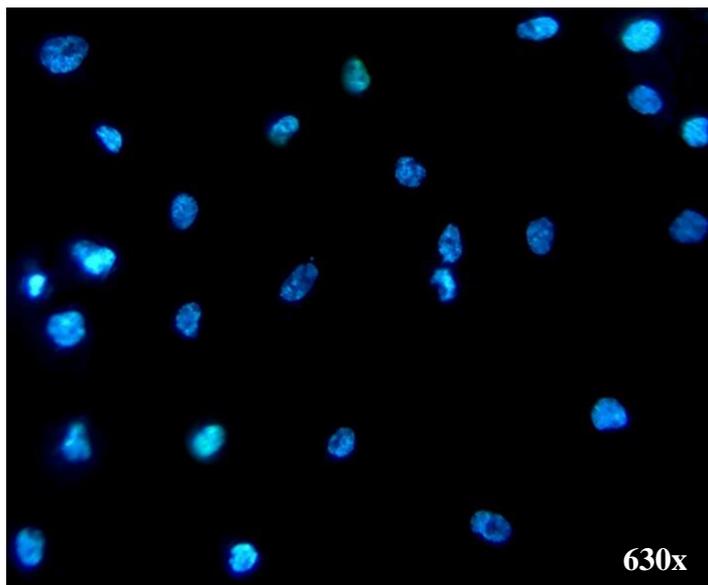


Fig.2: Fotomicroscopia de núcleos celulares marcados por Hoechst (em azul).

2.5 Dosagem das citocinas

Os sobrenadantes previamente coletados e congelados foram utilizados para dosagem dos níveis de IL-1 β e IL-12 pelo método ELISA Sanduíche. Para tanto, foi utilizado o kit comercial Peptotech (Rocky Hill, NJ, EUA) conforme recomendação do fabricante e em triplicata. Brevemente, microplacas de 96 poços (Corning Incorporated) foram sensibilizadas com 100 μ l de anticorpo de captura, para cada citocina, diluídos em PBS na concentração de 1 μ g/ml para posterior incubação “overnight” em temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução de PBS-T a 0,05% e bloqueadas com 300 μ l de solução de bloqueio (1% BSA) por pelo menos 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com 100 μ l das amostras testes e citocinas padrões (a concentração inicial da curva foi de 1ng/ml e 2ng/ml para IL1- β e IL12, respectivamente). As placas foram lavadas e 100 μ l de anticorpo de detecção diluído em diluente (0,05% Tween, 0,1% BSA em PBS) na concentração de 0,25 μ g/ml foram adicionados a cada poço para incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e 100 μ l de avidin-HRP conjugado foram adicionados por poço para incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem das placas, 100 μ l de substrato enzimático foi adicionado a cada poço e então as placas foram incubadas para o desenvolvimento da coloração. As leituras foram efetuadas em leitora de placa 405 nm com correção de comprimento de onda estabelecido em 650 nm. A concentração de cada

citocina foi determinada de acordo com a curva de regressão linear obtida pelas respectivas citocinas padrões.

2.6 Análise estatística

A estatística descritiva foi calculada utilizando o software SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, EUA). Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade de variâncias (Levene). Os parâmetros de viabilidade celular após 1 dia foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis, seguidos pelo pós-teste de Dunn. As comparações dos valores de viabilidade e adesão celulares após 7 e 14 dias foram realizadas pela Análise de Variância univariada (ANOVA one-way), seguida pelo teste Tukey quando necessário. Para todas as análises estatísticas, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Viabilidade celular

Os resultados de viabilidade celular foram medidos como absorvância pelo ensaio de MTT (Fig.3). No primeiro dia, USI apresentou maior viabilidade que os outros grupos, porém com diferença significativa apenas em relação ao grupo AA ($p < 0,001$). Após 7 dias, houve um aumento significativo na viabilidade para AA e BIO em relação ao grupo controle ($p = 0,047$ e $p = 0,003$, respectivamente), mas nenhuma diferença significativa quando comparados entre si. Apesar do aumento nos níveis de absorvância dos três grupos observado aos 14 dias, não houve diferença estatística entre eles.

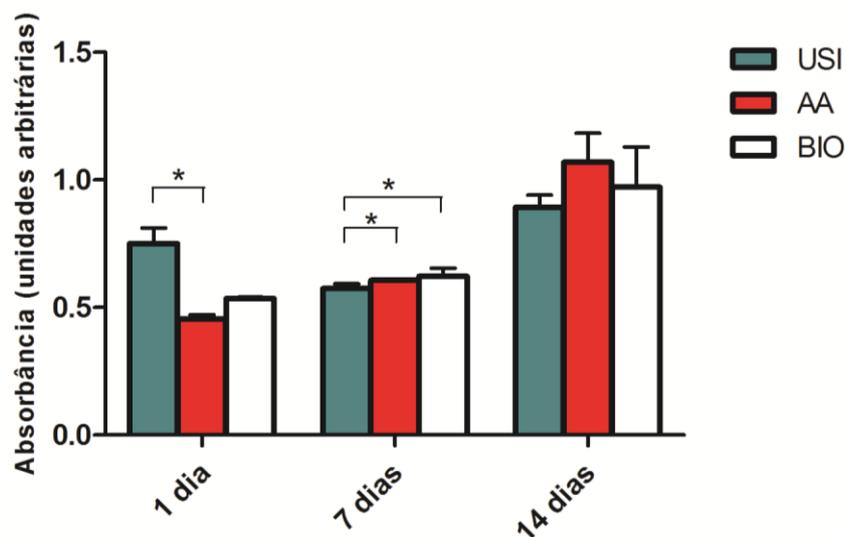


Fig.3: Viabilidade celular medida como absorbância (ensaio MTT) de células hFOB 1.19 cultivadas sobre as superfícies USI (usinada), AA (ataque ácido) e BIO (anodizada com CaP) após 1, 7 e 14 dias. Valores representados pela média \pm DP (desvio-padrão). *Diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

3.2 Adesão celular

Observando-se a adesão ao longo dos dois períodos experimentais estudados, nota-se que houve aumento no número de células aderidas para os grupos USI e BIO entre 7 e 14 dias e diminuição para AA (Fig.4). Após 7 dias de cultivo, USI teve uma alta quantidade de células aderidas comparado aos outros grupos, mas com diferença significativa apenas em relação a AA ($p=0,006$). Aos 14 dias, o número de células aderidas do grupo controle foi significativamente maior do que os outros dois grupos avaliados ($p<0,001$). AA e BIO também apresentaram diferença significativa entre si aos 14 dias, com maior adesão celular sobre as superfícies BIO ($p=0,001$).

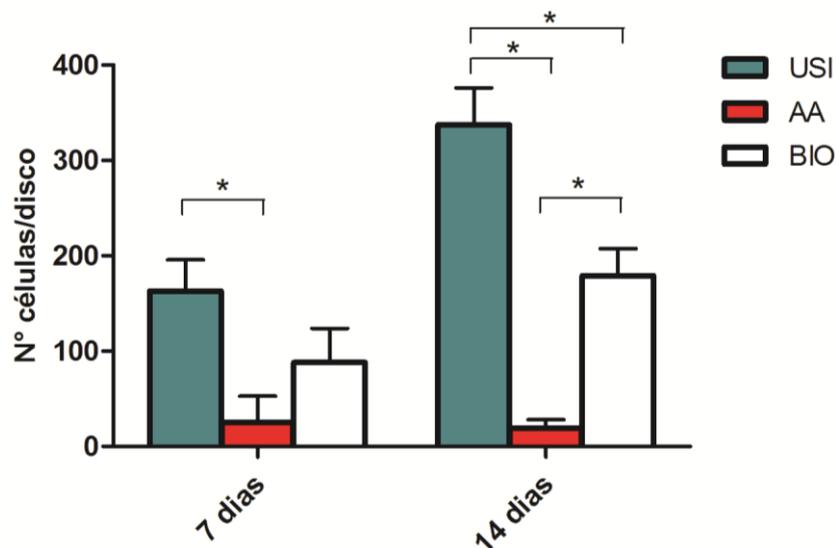


Fig.4: Adesão das células hFOB 1.19 sobre as superfícies USI (usinada), AA (ataque ácido) e BIO (anodizada com CaP) após 7 e 14 dias. A adesão celular é apresentada como a média \pm DP do número de núcleos marcados com Hoescht nas amostras dos diferentes tratamentos. *Diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

3.3 Dosagem de citocinas

O contato das células hFOB 1.19 com as diferentes superfícies de titânio causou a secreção de IL-1 β e de IL-12 de maneira idêntica entre os grupos, em todos os tempos experimentais em questão (Fig.5).

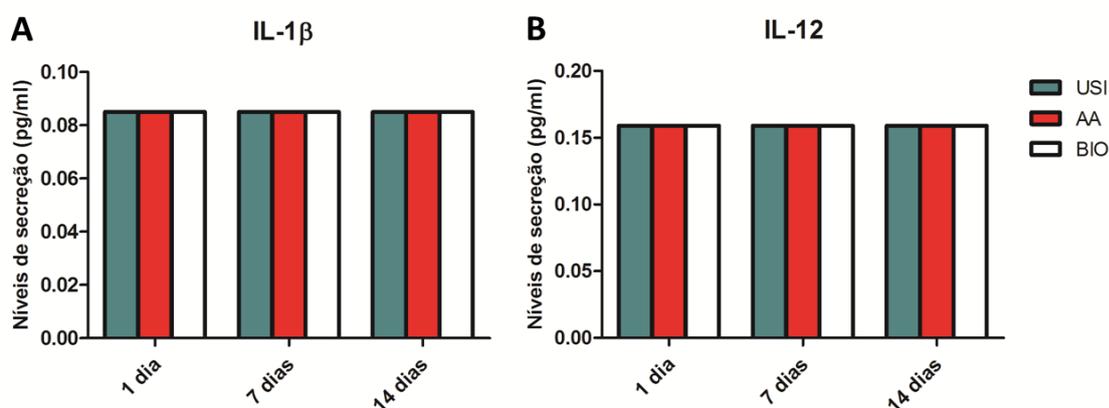


Fig.5: Níveis de IL1- β (A) e IL12 (B) secretados pelas células hFOB 1.19 cultivadas sobre as superfícies USI (usinada), AA (ataque ácido) e BIO (anodizada com CaP) após 1, 7 e 14 dias.

Durante o cultivo, o sobrenadante foi coletado e a dosagem das citocinas realizada por ELISA. Valores representados pela média \pm DP.

4. DISCUSSÃO

Diversos trabalhos mostraram a influência da rugosidade da superfície do implante na resposta celular (BOWERS et al., 1992; LE GUÉHENNEC et al., 2007; LEE et al., 2010; NOVAES-JÚNIOR et al., 2010; KUBIES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013), em particular dos osteoblastos, os quais exibem características fenotípicas dependentes da rugosidade. No presente trabalho, buscou-se avaliar além da rugosidade, o efeito da composição da superfície sobre eventos celulares bem documentados em estudos *in vitro*, como a viabilidade e adesão de osteoblastos, bem como sobre eventos que sucedem a adesão, como a secreção de interleucinas, relatadas como importantes tanto na resposta inflamatória desencadeada, quanto na remodelação óssea.

A viabilidade celular de osteoblastos hFOB 1.19 mostrou ser influenciada pela modificação da superfície. Inicialmente (após 1 dia), as células tendem a ser mais viáveis nas superfícies lisas, mas logo as superfícies mais rugosas e hidrofílicas passam a ser favorecidas. Estes resultados estão em desacordo com os achados de Lee et al. (2010) que encontraram significativa viabilidade celular favorável às superfícies mais rugosas (anodizadas e jateadas/ataque ácido) logo após 1 dia de cultura, que se manteve nos tempos experimentais seguintes (2 e 3 dias). Entretanto, a comparação com esses resultados deve ser feita com cautela uma vez que outros materiais e tipos celulares foram utilizados. Oliveira et al. (2013) ao avaliarem as mesmas superfícies estudadas no presente estudo, após 3 e 7 dias, observaram uma maior viabilidade celular para as superfícies rugosas (ataque ácido e anodizada com CaP) em ambos os tempos experimentais mas significativamente apenas aos 7 dias. Talvez se estes autores tivessem avaliado o período de 24h, pudessem ter encontrado resultados favoráveis para as superfícies usinadas, tal qual no presente trabalho.

Considerando que as células podem estar viáveis, mas não estarem aderidas ao substrato, a adesão celular é um importante parâmetro a ser avaliado. A maior adesão de osteoblastos 1.19 encontrada nas superfícies lisas em ambos os tempos experimentais estudados confirma esta preocupação. Apesar de as superfícies AA e BIO terem um maior número de células viáveis aos 7 e 14 dias, estas células estão mais desaderidas do que no grupo controle. Considerando que as células só iniciam sua proliferação após estarem

aderidas, este estudo falhou em mostrar que superfícies mais rugosas ou com modificação em sua composição favorecem positivamente os eventos iniciais da neo-osteogênese. Diferentemente dos nossos achados, outros estudos mostraram que superfícies mais rugosas apresentam maior adesão e proliferação celular (TAKEBE et al., 2000; ZHANG et al., 2004; KUBIES et al., 2011; PAE et al., 2011).

Ainda, de acordo com Anselme e Bigerelle (2005), os osteoblastos se aderem, distribuem e proliferam mais rapidamente em superfícies usinadas do que em rugosas, assim como encontrado no presente estudo. Superfícies mais rugosas parecem influenciar positivamente parâmetros como a diferenciação osteoblástica, a mineralização da matriz e a produção de fatores de crescimento (Cooper et al., 1998). Em relação à influência da composição química no caso das superfícies anodizadas, Lee et al. (2010) sugerem que a organização e o estado cristalino das coberturas de CaP parecem ter papel crucial no comportamento celular, podendo ser mais ou menos favorável à proliferação celular. No entanto, estudos químicos específicos sobre distribuição do tamanho do poro, porosidade e cristalinidade seriam necessários para determinar qual a estrutura e fase do cristal a superfície usada neste trabalho apresenta, o que a priori não foi o foco deste estudo.

Uma vez aderidas, as células hFOB 1.19 proliferam e diferenciam em osteoblastos maduros que secretam moléculas sinalizadoras a fim de estimular a remodelação óssea. Desta maneira, duas citocinas com ações antagônicas neste processo foram analisadas, IL-1 β e IL-12. A IL-1 β atua na ativação de osteoclastos estimulando a reabsorção óssea (GARLET et al., 2004) por meio da regulação positiva de RANKL, o ligante para o fator nuclear Kappa B produzido por osteoblastos e células estromais que induz a diferenciação osteoclástica (GARCÍA-LÓPEZ et al., 2005). Esta citocina ainda está relacionada com a produção de metaloproteinases (CHANG et al., 2002), importantes no processo de degradação das fibras colágenas, contribuindo assim tanto para o “turn over” ósseo quanto para a progressão de uma possível periimplantite. Já a IL-12 tem sido relacionada como inibidora da osteoclastogênese *in vitro*, isto é, da formação de osteoclastos e consequente reabsorção óssea (GARCÍA-LÓPEZ et al., 2005). Diferentemente da IL-1 β , a IL-12 inibe a expressão de RANKL via mediação por IFN- γ , inibindo a diferenciação de osteoclastos (NAGATA et al., 2003). Desta forma, os níveis destas interleucinas com papéis antagônicos em células osteoblásticas cultivadas sobre diferentes superfícies de titânio são úteis na predição se a reabsorção óssea ou deposição óssea estaria sendo induzida em maior ou menor grau por cada tratamento.

A produção de IL-1 β e IL-12 mostrou-se abaixo da sensibilidade de detecção dos kits comerciais em todos os tempos experimentais e independente do tipo de tratamento de superfície. Esse resultado pode estar relacionado com a também baixa adesão das células aos discos de titânio, o que teria contribuído para os níveis reduzidos de secreção das citocinas. No entanto, esperaria-se então que pelo menos nas superfícies usinadas, que tiveram uma maior adesão celular, isto se refletisse na síntese dos mediadores analisados, o que não ocorreu. Assim, acreditamos que os baixos níveis de secreção se devem à linhagem de células utilizadas neste estudo, uma linhagem de células osteoprogenitoras que requerem mais etapas até sua diferenciação em osteoblastos maduros e cujos períodos de tempo avaliados podem não ter sido suficientes para o término da mesma.

Spyrou et al. (2002) observaram que a síntese das interleucinas IL-1, IL-6 e IL-18 (cuja atividade é sinérgica à IL-12) por osteoblastos mostrou-se influenciada pela rugosidade e tratamento de superfície, após 1, 3, 5 e 7 dias de cultura. No entanto, diferentemente do nosso trabalho, os autores utilizaram uma linhagem de osteoblastos maduros imortalizados originalmente isolados a partir de osteosarcoma (SaOS-2), o que pode explicar esses resultados conflitantes. Células provenientes de tumores malignos supostamente proliferam-se mais que osteoblastos humanos normais (PAUTKE et al., 2004), como os utilizados nesta pesquisa.

Sob o aspecto da inflamação, é interessante notar que sendo IL-1 β e IL-12 citocinas pró-inflamatórias, nenhum tratamento de superfície estimulou uma secreção exacerbada das mesmas. A secreção destas citocinas também pode ter sido baixa porque não houve estímulo externo, em consonância com estudos prévios que utilizaram cultura de macrófagos não estimulados (GRETZER et al., 2003; MOURA et al., 2011). Foi encontrado que macrófagos, por exemplo, aumentam a secreção de citocinas pró-inflamatórias após a estimulação por LPS (lipopolissacarídeo) em diferentes materiais de superfície (THOMSEN e GRETZER, 2001; REFAI et al., 2004; GÖRANSSON et al., 2006). Parece ainda haver uma correlação entre maior secreção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos estimulados com o aumento da rugosidade de superfície (REFAI et al., 2004).

Levando em consideração que este estudo avaliou três superfícies de implante disponíveis comercialmente, a maior rugosidade de AA e BIO ou mesmo a modificação da composição química de BIO não influenciaram positivamente os parâmetros biológicos iniciais avaliados (viabilidade e adesão celulares) como era de se esperar. A linhagem osteoprogenitora estudada foi mais viável e se aderiu mais à superfície usinada (controle) e, independente do tempo experimental e da superfície, não sintetizou quantidade significativa

das interleucinas IL-1 β e IL-12. Estes resultados confirmam a importância de se continuar avaliando as superfícies disponíveis no mercado que tanto focam nas modificações físicas e químicas, até mesmo para validação de seu uso clínico. Assim, outros estudos *in vitro* são necessários utilizando tempos experimentais maiores e uma linhagem de osteoblastos maduros, em co-cultura com macrófagos, estimulados ou não, a fim de melhor avaliar a síntese das interleucinas em questão. Além disso, considerando que a rugosidade e a composição da superfície parecem influenciar muito mais a diferenciação do que viabilidade e adesão, a diferenciação osteoblástica também deve ser avaliada, assim como a estrutura e fase do cristal de CaP formado.

5. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada neste estudo e com os resultados obtidos, pode-se concluir que dentre as superfícies estudadas, o grupo controle (usinado) influenciou positivamente os eventos iniciais da neo-osteogênese *in vitro*, como viabilidade e adesão celulares, não desencadeando uma produção exacerbada de citocinas envolvidas com a remodelação óssea e a inflamação.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG (Projeto: BIO 016/2011) pelo apoio financeiro na forma de bolsa de iniciação científica; ao Laboratório de Biomateriais e Biomimetismo Celular (LABIOCEL) da Faculdade de Odontologia; e ao Laboratório de Análise de Imagem do Setor de Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, pela valiosa colaboração com esta pesquisa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANSELME, K.; BIGERELLE, M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. **Acta Biomater**, v.1, n.2, p.211-222, Mar. 2005.
2. BARRÈRE, F.; LAYROLLE, P.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; de Groot, K. Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of

- octacalcium phosphate and inhibition by Mg^{2+} and HCO_3^- . **Bone**, v.25, n.2, p.107S-111S, Aug. 1999.
3. BONFANTE, E.A.; GRANATO, R.; MARIN, C.; SUZUKI, M.; OLIVEIRA, S.R.; GIRO, G.; COELHO, P.G. Early bone healing and biomechanical fixation of dual acid-etched and as-machined implants with healing chambers: an experimental study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.26, n.1, p.75-82, 2011.
 4. BOWERS K.T.; KELLER J.C.; RANDOLPH B.A; WICK, D.G.; MICHAELS, C.M. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.7, n.3, p.302-310, 1992.
 5. BUSER, D.; BROGGINI, N.; WIELAND, M.; SCHENK, R.K.; DENZER, A.J.; COCHRAN, D.L.; HOFFMANN, B.; LUSSI, A.; STEINEMANN, S.G. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. **J Dent Res**, v.83, n.7, p.529-533, 2004.
 6. CHANG, Y.C.; YANG, S.F.; LAI, C.C.; Liu, J.Y.; Hsieh, Y.S. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. **J Periodontal Res**, v.37 p.196-203, 2002.
 7. COELHO, P.G.; GRANJEIRO, J.M.; ROMANOS, G.E.; SUZUKI, M.; SILVA, N.R.; CARDAROPOLI, G.; THOMPSON, V.P.; LEMONS, J.E. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. **J Biomedical Mater Res B Appl Biomater**, v.88, n.2, p.579-596, Feb. 2009.
 8. COOPER, L.F.; MASUDA, T.; YLIHEIKKILA, P.K.; FELTON, D.A. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. **Int J Oral Maxillofac Impl**, v.13, p.163-174, Mar-Apr. 1998.
 9. DOS SANTOS M.V.; ELIAS C.N.; CAVALCANTI-LIMA J.H. The Effects of Superficial Roughness and Design on the Primary Stability of Dental Implants. **Clin Implant Dent Relat Res**, v.13, n.3, p.215-23, 2011.
 10. EHRENFEST, D.M.D.; COELHO, P.G.; KANG, B.S.; SUL, Y.T.; ALBREKTSSON, T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry, and topography. **Trends Biotechnol**, v.28, n.4, p. 198-206, 2010.
 11. ELIAS, C.N. Titanium dental implant surfaces. **Rev Matéria**, v.15, n.2, p.140-144, 2010.

12. ELIAS, C.N.; BUSQUIM, T.; LIMA, J.H.C.; MULLER, C.A. Caracterização e torque de remoção de implantes dentários com superfície bioativa. **Rev bras odontol**, v.65, n.2, p.273-279, 2008.
13. ELIAS, C.N.; OSHIDA, Y.; LIMA, J.H.; MULLER, C.A. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. **J Mech Behav Biomed Mater**, v.1, n.3, p.234-242, 2008.
14. FRANCISCHONE, C.E.; MENUCCI-NETO, A. **Bases clínicas e biológicas na implantodontia**. 1. ed. São Paulo: Santos Editora, 2009. 256 p.
15. FRIBERG, B.; GRONDAHL, K.; LEKHHHOLM, U.; BRÅNEMARK, P.I. Long-term follow-up of severely atropic edentulous mandibles reconstructed with short Branemark implants. **Clin Implant Dent Relat Res**, v.2, n.4, p.184-189, 2000.
16. GARCÍA-LÓPEZ S.; MEIKLE M.C.; VILLANUEVA R.E.; MONTAÑO, L.; MASSÓ, F.; RAMÍREZ-AMADOR, V.; BOJALIL, R. Mechanical deformation inhibits IL-10 and stimulates IL-12 production by mouse calvarial osteoblasts in vitro. **Arch Oral Biol**, v.50, n. 4, p.449-452, 2005.
17. GARLET, G.P.; MARTINS-JÚNIOR, W.; FONSECA, B.A.; FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v.31, p.671-679, 2004.
18. GITTENS, A.R.; MCLACHLAN, T.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; CAI, Y.; BERNER, S.; TANNENBAUM, R.; SCHWARTZ, Z.; SANDHAGE, K.H.; BOYAN, B.D. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. **Biomaterials**, v.32, n.13, p.3395-3402, 2011.
19. GÖRANSSON, A.; GRETZER, C.; JOHANSSON, A.; SUL, Y.T.; WENNERBERG, A. Inflammatory response to a titanium surface with potential bioactive properties: an in vitro study. **Clin Implant Dent Relat Res**, v.8, n.4, p.210-217, 2006.
20. GRETZER C.; GISSELFALT K.; LILJENSTEN E.; RYDÉN, L.; THOMSEN, P. Adhesion, apoptosis and cytokine release of human mononuclear cells cultured on degradable poly(urethane urea), polystyrene and titanium *in vitro*. **Biomaterials**, v.24, n.17, p.2843–2852, 2003.
21. KUBIES, D.; HIMMLOVÁ, L.; RIEDEL, T.; CHÁNOVÁ, E.; BALÍK, K.; DOUDĚROVÁ, M.; BÁRTOVÁ, J.; PEŠÁKOVÁ, V. The Interaction of Osteoblasts

- With Bone-Implant Materials: 1. The Effect of Physicochemical Surface Properties of Implant Materials. **Physiol Res**, v.60, p.95-111, 2011.
22. LAVENUS, S.; LOUARN, G.; LAYROLLE, P. Nanotechnology and Dental Implants. **Int J Biomater**, v.2010, p.915327, 2010.
23. LE GUÉHENNEC, L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dent Mater**, v.23, n.7, p.844-854, Jul. 2007.
24. LEE, J.M.; LEE, J.I.; LIM, Y.J. In vitro investigation of anodization and CaP deposited titanium surface using MG63 osteoblast-like cells. **Appl Surf Sci**, v.256, n.10, p.3086-3092, Mar. 2010.
25. LERNER, U.H. Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biol**, v.19, p.107–120, 2000.
26. LINCKS, J.; BOYAN, B.D.; BLANCHARD, C.R.; LOHMANN, C.H.; LIU, Y.; COCHRAN, D.L.; DEAN, D.D.; SCHWARTZ, Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. **Biomaterials**, v.19, n.23, p.2219-2232, 1998.
27. LIU, X.; LIM, J.Y.; DONAHUE, H.J.; DHURJATI, R.; MASTRO, A.M.; VOGLER, E.A. Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hfob 1.19: phenotypic and genotypic responses observed in vitro. **Biomaterials**, v.28, n.31, p.4535-4550, 2007.
28. LIU, Y.; DE GROOT, K.; HUNZIKER, E.B. Osteoinductive implants: the mise-en-scène for drug-bearing biomimetic coatings. **Ann Biomed Eng**, v.32, n.3, p.398-406, 2004.
29. MENDES, V.C.; MOINEDDIN, R.; DAVIES, J.E. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. **Biomaterials**, v.28, n.32, p.4748-4755, 2007.
30. MOURA, C.C.; SOARES, P.B.; SOUZA, M.A.; ZANETTA-BARBOSA, D.. Effect of titanium surface on secretion of IL1 β and TGF β 1 by mononuclear cells. **Braz Oral Res**, v.25, n.6, p.500-505, 2011.
31. MOURA, C.C.G.; SOUZA, M.A.; DECHICHI, P.; ZANETTA-BARBOSA, D.; TEIXEIRA, C.C.; COELHO, P.G. The effect of a nanothickness coating on rough titanium substrate in the osteogenic properties of human bone cells. **J Biomed Mater Res A**, v.94, n.1, p.103-111, Jul. 2009.

32. NAGATA N.; KITaura H.; YOSHIDA N.; NAKAYAMA, K. Inhibition of RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cultures by IL-12: involvement of IFN- γ possibly induced from non-T cell populations. **Bone**, v.33, p.721–732, 2003.
33. NANJI, A.; MCKEE, M.D.; ZALZAL, S. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of the tissue response to metal implants in the rat tibia. In: Davidovitch, Z. & Mah, J., eds. **Biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants**. Boston: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics, p.487-500, 1998.
34. NARAYANAN, R.; SESHADRI, S.K.; KWON, T.Y.; KIM, K.H. Calcium Phosphate-Based Coatings on Titanium and Its Alloys. **J Biomed Mater Res Part B**, v.85, n.1, p.279-299, 2008.
35. NOVAES-JÚNIOR, A.B.; SOUZA, S.L.S.; BARROS, R.R.M.; PEREIRA, K.K.; IEZZI, G.; PIATTELLI, A. Influence of Implant Surfaces on Osseointegration. **Braz Dent J**, v.21, n.6, p.471-481, 2010.
36. OLIVEIRA, N.C.M.; MOURA, C.C.G.; ZANETTA-BARBOSA, D.; MENDONÇA, D.B.; COOPER, L.; MENDONÇA, G.; DECHICHI, P. Effects of titanium surface anodization with CaP incorporation on human osteoblastic response. **Mater Sci Eng C**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.002>, 2013.
37. OMAR, O.M.; LENNERÅS, M.E, SUSKA, F.; EMANUELSSON, L.; HALL, J.M.; PALMQUIST, A.; THOMSEN, P. The correlation between gene expression of proinflammatory markers and bone formation during osseointegration with titanium implants. **Biomaterials**, v.32, n.2, p.374-386, Jan. 2011.
38. OMAR, OM.; LENNERAS, M.E.; SVENSSON, S.; SUSKA, F.; EMANUELSSON, L.; HALL, J.; NANNMARK, U.; THOMSEN, P. Integrin and chemokine receptor gene expression in implant-adherent cells during early osseointegration. **J Mat Sci Mater Med**, v.21, n.3 p.969-980, Mar. 2010.
39. PAE, A.; KIM, S.S.; KIM, H.S.; WOO, Y.H. Osteoblast-like cell attachment and proliferation on turned, blasted, and anodized titanium surfaces. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.26, p.475-481, 2011.
40. PAUTKE C.; SCHIEKER M.; TISCHER T.; Kolk, A.; NETH, P.; MUTSCHLER, W.; MILZ, S. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. **Anticancer Res**, v.24, n.6, p.3743-3748, 2004.

41. REFAI, A.K.; TEXTOR, M.; BRUNETTE, D.M.; WATERFIELD, J.D. Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. **J Biomed Mater Res A**, v.70, p.194-205, 2004.
42. ROCCI, M.; ROCCI, A.; MARTIGNONI, M.; ALBREKTSSON, T.; BARLATTANI, A.; GARGARI, M. Comparing the TiO blast and Osseospeed surfaces. Histomorphometric and histological analysis in humans. **Oral Implantol (Rome)**, v.1, n.1, p.34-42, 2008.
43. SCHLIEPHAKE, H.; SCHARNWEBER, D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. **J Mater Chem**, v.18, p.2404-2414, 2008.
44. SCHLIEPHAKE, H.; SCHARNWEBER, D.; DARD, M.; SEWING, A.; AREF, A.; ROESSLER, S. Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. **J Biomedical Mater Res B Appl Biomater**, v.73, n.1, p.88-96, Apr. 2005.
45. SPYROU, P.; PAPAIOANNOU, S.; HAMPSON, G.; BRADY, K.; PALMER, R.M.; MCDONALD, F. Cytokine release by osteoblast-like cells cultured on implant discs of varying alloy compositions. **Clin Oral Implants Res**, v.13, n.6, p.623-630, 2002.
46. TAKEBE, J.; ITOH, S.; OKADA, J.; ISHIBASHI, K. Anodic oxidation and hydrothermal treatment of titanium results in a surface that causes increased attachment and altered cytoskeletal morphology of rat bone marrow stromal cell *in vitro*. **J Biomed Mater Res**, v. 51, n.3, p.298-407, 2000.
47. THOMSEN P.; GRETZER C. Macrophage interactions with modified material surfaces. **Curr Opin Solid State Mater**, v.5, p.163-176, 2001.
48. TOMSIA, A.P.; LAUNEY, M.E.; LEE, J.S.; MANKANI, M.H.; WEGST, U.G.; SAIZ, E. Nanotechnology Approaches to Improve Dental Implants. **Int J of Oral Maxillo fac Implants**, v.26, Suppl:25-44, discussion 45-9, 2011.
49. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v.20, suppl.4, p.172-184, Sep. 2009.
50. YANG, Y.; KIM, K.H.; ONG, J.L. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process-an alternative to plasma spraying. **Biomaterials**, v.26, n.3, p.327-337, Jan. 2005.
51. ZHANG, Y.M.; BATAILLON-LINEZ, P.; HUANG, P.; ZHAO, Y.M.; HAN, Y.; TRAISNEL, M.; XU, K.W.; HILDEBRAND, H.F. Surface analyses of micro-arc

oxidized and hydrothermally treated titanium and effect on osteoblast behavior. **J Biomed Mater Res A**, v.68, n.2, p.383-391, 2004.