

Implantes dentários à base de titânio favorecem via de sinalização celular envolvidas com sobrevivência e proliferação de osteoblastos

Titanium-based dental implants favor cell-signaling pathway involved in the survival and proliferation of osteoblasts

BEZERRA, Fábio¹; ROSSI, Mariana Correa²; FERNANDES, Célio Junior da Costa³; NASCIMENTO, Augusto⁴; FERREIRA, Marcel Rodrigues⁴; ZAMBUZZI, William Fernando⁵

1. Doutorando em Biotecnologia, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

2. Mestranda em Biotecnologia, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

3. Graduando em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

4. Mestrando em Biotecnologia, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

5. Doutor em Bioquímica. Professor Assistente Doutor do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

William Fernando Zambuzzi

Instituto de Biociências

Campus de Botucatu - UNESP

Distrito de Rubião Junior, S/N

18618-970 - Botucatu - São Paulo - Brasil

E-mail: wzambuzzi@ibb.unesp.br

Recebido: 10/02/2014

Aceito: 30/04/2014

RESUMO

As tendências atuais na terapia com implantes têm incluído a modificação de suas superfícies utilizando ferramentas de nanotecnologia e princípios de bioengenharia, aumentando seu desempenho quando implantado. Mesmo com algum avanço nesta área de modificações de superfície, ainda pouco se sabe quanto aos efeitos indiretos exercidos pelos implantes em células que compõem o tecido hospedeiro e que ainda não estão em contato direto com suas superfícies. Assim, decidimos verificar o efeito do meio condicionado de implantes comerciais em proteínas responsáveis pela proliferação celular, em osteoblastos. Primeiro, avaliamos se os implantes eram capazes de liberar substâncias tóxicas, capazes de lesar as células; para isso fizemos uso do ensaio de MTT, uma metodologia clássica na literatura e recomendada pela ISO para testes de citotoxicidade. Nossos resultados mostraram que os implantes dentários analisados não são citotóxicos e que promovem uma maior atividade mitocondrial. Posteriormente, osteoblastos foram tratados com meio condicionado dos implantes por 24 horas e amostras coletadas para avaliarmos a expressão de MAPK-ERK e p38, proteínas envolvidas com a sobrevivência celular e proliferação de células eucarióticas. Nossos resultados mostram uma maior expressão de MAPK ERK e p38 em osteoblastos tratados com meio condicionado de implantes dentários. Em conjunto, nossos resultados fortemente contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos em resposta a implantes odontológico à base de titânio, mostrando seu efeito em proteínas envolvidas com sobrevivência e proliferação de osteoblastos.

Palavras-chave: Osteoblastos. Sobrevivência celular. Implantes dentários.

ABSTRACT

The current tendencies in implant therapy have included the use of surface treatment with nanotechnology and principles of bioengineering in order to improve performance. Although there has been progress in research surrounding surface treatment, little is known regarding the indirect effects of surface treated implants on cells that make up the host tissue and are not in direct contact with the surface. In light of this, we decided to measure the effects of the conditioned medium from commercial implants on proteins responsible for cell proliferation in the osteoblast. We first evaluated if the implants released any toxic substances that could potentially cause cell damage. To do so, we used MTT testing, a classic methodology recommended by the ISO for cytotoxicity tests. Our results showed that the analyzed dental implants are non-cytotoxic and they promote increased mitochondrial activity. Subsequently, osteoblasts were treated with the conditioned medium of implants for 24 hours. Samples were collected to evaluate the expression of MAPK-ERK and p38, proteins involved in cellular proliferation and survival of eukaryotic cells. Our results show increased expression of p38 and MAPK-ERK in osteoblasts treated with the conditioned medium of dental implants. Together, our results strongly contribute to a greater understanding of the mechanisms involved in the body's response to titanium-based dental implants, showing their effect on proteins involved in the survival and proliferation of osteoblasts.

Keywords: Osteoblasts. Cellular survival. Dental implants.

INTRODUÇÃO

O entendimento da biologia do osso tem se tornado cada vez mais necessário para os dias atuais²³. Nas próximas décadas, o custo social da saúde no Brasil deverá enfrentar um crescimento populacional potencialmente perigoso, onde a evolução do perfil demográfico aponta para o aumento progressivo da idade média das populações humanas. Gera-se, assim, a necessidade de garantir cada vez mais a qualidade da vida através de um custo e carga sociais aceitáveis. Em relação a implantes osteointegráveis, sabe-se que para uma boa estabilidade mecânica do implante ósseo é necessário haver um bom contato entre a superfície do material e células do hospedeiro. É certo que parâmetros adicionais agregam novas características durante o desenvolvimento de novos materiais ou superfícies, aumentando o desempenho do material e diminuição do tempo de reabilitação do paciente.

Durante a osteointegração de implantes, sabe-se que a perfeita interação de osteoblastos na superfície de materiais implantados garante sua rápida osteointegração, principalmente pelos processos seqüenciais de proliferação e diferenciação. Estes mecanismos celulares são rigorosamente controlados por mecanismos de transdução de sinais, os quais respondem a estímulos diversos, como as propriedades químicas das superfícies de materiais^{6-7,10-11}. Neste sentido, temos centrado esforços em conhecer os mecanismos de transdução de sinais que regem a adesão de osteoblastos sobre superfícies físico-quimicamente conhecidas, para que possam servir de parâmetros de análises para outros testes, onde não se conhece a capacidade adesiva de determinados materiais^{1,8,20}. Em estudo recente, nossos resultados mostraram que nas primeiras 2 horas pós-plaqueamento o metabolismo dos osteoblastos culmina em diferentes vias de sinalização responsáveis pelo rearranjo do citoesqueleto, com sinais oriundos da ativação de proteínas como MAPKp38 e FAK^{18,28,33}. Embora algum progresso tenha sido alcançado neste sentido, muito ainda precisa ser descoberto sobre estes mecanismos em outras condições, para que haja uma transferência direcionada de conhecimento ao setor de desenvolvimento de materiais. As vias de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), ERK, JNK e p38, integram sinais de uma grande variedade de estímulos juntamente com outras vias de sinalização como PKA, PKC e PI3K/Akt, e promovem respostas como proliferação e sobrevivência celular^{2-3,9,12-17,26}.

Como descrito anteriormente, o avanço na prática da biologia permitiu que cientistas avançassem em diferentes direções, alcançando níveis do conhecimento que capazes de impactar o desenvolvimento de novos biomateriais^{10-11,27}. Por sua vez, a atividade de proteínas quinases é responsável pela regulação de muitos processos biológicos através de cascatas de sinalização que levam a diferentes efeitos celulares. Portanto, explorar o efeito de diferentes substratos no fenótipo diferencial de osteoblastos pode ter importantes

implicações no entendimento dos mecanismos pelos quais as células respondem a diferentes substratos, auxiliando no desenvolvimento de novos biomateriais como eficazes substitutos artificiais do osso^{4,21,24-25}.

Assim, nosso objetivo foi compreender se efeitos indiretos de implantes dentários comerciais de titânio afetam proteína envolvidas com vias de transdução de sinais responsáveis pela sobrevivência e proliferação de osteoblastos.

MATERIAL E MÉTODOS

IMPLANTES

Os implantes dentários foram doados pela empresa SIN Sistema de Implante (São Paulo, SP, Brasil).

CULTURA DE CÉLULAS

Utilizou-se a linhagem MC3T3-E1 (pre-osteoblastos, subclone 4). Resumidamente, após obtenção do tapete celular, as células serão mantidas e cultivadas em meio de cultura adequado para as duas linhagens contendo antibióticos (100U/ml penicilina, 100mg/ml estreptomicina), e 10% Soro Fetal Bovino (SFB, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). Durante todo o experimento as células serão mantidas a 37°C e à atmosfera de 5% de CO₂.

DESENHO EXPERIMENTAL

Os implantes (n = 6) foram incubados em meio de cultura adequado por 24 horas (ISO 10993-5), sem Soro Fetal Bovino, a fim de estabelecermos o meio condicionado. Este meio condicionado contém moléculas/partículas potencialmente liberadas pelos implantes. O meio condicionado foi utilizado para tratar as células, com o intuito de conhecermos sua citotoxicidade e capacidade de modular a expressão de ERK, proteína envolvida com a sobrevivência e proliferação celular.

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE IMPLANTES DENTÁRIOS

As células MC3T3 - E1 foram ressuscitadas em meio de cultivo apropriado e semeadas [100 L de células (5x10⁴ células/mL)] em placas de 96 poços (TPP, EUA). Após 24 horas, as células foram desafiadas com meio condicionado dos implantes por mais 24 horas. Após este período, a citotoxicidade foi avaliada através de um teste colorimétrico utilizando “Thiazolyl Blue Tetrazolium” (MTT). Resumidamente, após 24 horas, o meio de cultura foi suavemente removido e 100 L de solução de MTT (1 mg de MTT/ml de meio de cultura) foi adicionada a cada poço, mantido durante 3 h a 37°C. Após a incubação, o meio foi

removido e o formazano formado foi suspenso em 100 L de DMSO. Após, a absorbância foi medida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas.

AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE ERK

As células foram tratadas com o meio condicionado e, após 24 horas, foram lisadas para estudo do envolvimento de ERK por western blotting. Após serem lisadas (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Tween 20, 0.25% desoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM *O*-Vanadato, 1 mM NaF, e inibidores de proteases [1 µg/mL de aprotinina, 10 µg/mL de leupeptina e 1 mM 4-cloridrato de fluoreto aminoetil benzosulfonila]) por 2 horas em gelo. Os extratos protéicos foram centrifugados e a concentração de proteínas determinada pelo método de Lowry. Aos extratos foi adicionado tampão de amostra na proporção 1:1 (Tampão de amostra: 2X dodecil sulfato de sódio (SDS), 100 mM Tris-HCl [pH 6.8], 200 mM de ditioneitol (DTT), 4% SDS, 0.1% azul de bromofenol e 20% de glicerol. Os extratos celulares, correspondendo a 3 x 10⁵ células, foram resolvidos por eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (PAGE) e transferidos para membranas de PVDF. Estas foram bloqueadas em 1% de leite desnatado e incubados overnight a 4°C com anticorpos primários específicos. Após a lavagem em TBS-Twen 20 (0.05%), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase por 1 hora. A detecção foi feita através por quimioluminescência.

ANÁLISES DOS RESULTADOS

As bandas obtidas pela técnica de western blotting foram analisadas através da metodologia densitométrica (Image pro-puls). Os valores arbitrários foram confrontados empregando-se o teste t-student, onde todas as medidas o será de 5% bicaudal, ou seja, a significância estatística será considerada para valores de $p < 0.05$. Os ensaios paramétricos serão submetidos ao teste de normalidade e, dependendo do resultado, submetidos à análise de variância ou teste de Kruskal-Wallis, considerando significativas diferenças quando $p < 0.05$. Os gráficos foram construídos pelo programa GraphPad Prism Software, Versão 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, decidimos verificar se os meios condicionados de implantes dentários comerciais exerciam alguma citotoxicidade. O teste de citotoxicidade tem como objetivo detectar o potencial de um material ou dispositivo em produzir efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos a nível celular. Este teste deve ser aplicado a todas as categorias de biomateriais. A liberação de substâncias tóxicas pelo material pode lesar as células ou reduzir a taxa de crescimento celular da cultura.

Assim, incubamos estes implantes em meio de cultivo

celular por 24 horas (0.1g/mL), como instruído pela ISO 10993-5. Após este período, tratamos osteoblastos que foram plaqueados em placas de cultivo de 24 poços, na densidade de 50.000 células/mL. Após tratamento, aplicamos a metodologia de redução do MTT¹⁹ para verificar o potencial citotóxico do meio condicionado dos implantes. A técnica de MTT é um ensaio quantitativo para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazana, produto formado pela redução de tetrazolium MTT¹⁹. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida de função mitocondrial.

Nossos resultados mostraram que não houve nenhum indicio de citotoxicidade neste modelo experimental (Figura 1); ao contrário, notamos uma maior atividade mitocondrial no grupo tratado com o meio condicionado de implantes dentários. Este aumento sugere uma maior proliferação, no entanto, para maiores esclarecimentos neste cenário celular, devemos analisar proteínas envolvidas com vias de sinalização celular que regem mecanismos de sobrevivência e proliferação²⁹⁻³².

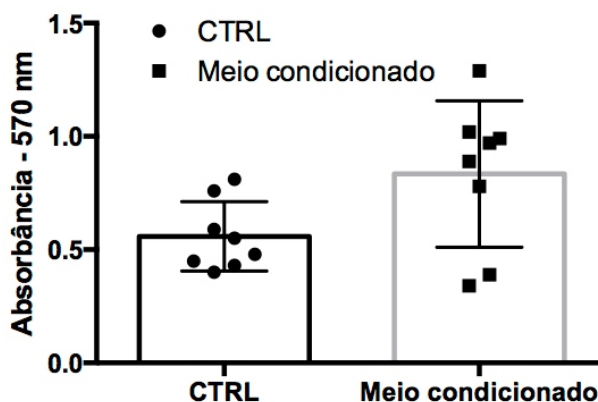


Figura 1 - Ensaio de citotoxicidade. Osteoblastos foram tratados por 24 horas com meio condicionado a partir de implantes comerciais nacionais. Para avaliar a citotoxicidade, após o tratamento, as células foram incubadas por 4 horas com meio de cultivo contendo sal de MTT (1mg/mL). Após este período, todo o meio de cultivo foi aspirado e o azul de formazano formado foi dissolvido em álcool absoluto e a absorbância medida em 570 nm.

Uma vez identificada a não toxicidade do meio condicionado por implantes comerciais e apontada ativação de maquinaria molecular envolvida com proliferação e sobrevivência celular, decidimos investigar a expressão de MAPK ERK e p38. Assim, tratamos osteoblastos com meio condicionado por 24 horas e coletamos amostras para análise destas proteínas por Western Blotting (WB). Antes das análises por WB, dosamos a concentração de proteínas: nossos resultados mostraram que não houve grande variação; esta etapa é importante e decisiva para que apliquemos no Western Blotting a mesma quantidade de proteína para o grupo controle e tratado⁵.

Os resultados referentes ao envolvimento de MAP ERK e p38 estão apresentados na Figura 2. Nossos resultados a partir do western blotting mostraram que houve variação entre o grupo condicionado e seu respectivo controle (onde as células foram mantidas em meio de cultivo convencional) quanto à expressão de ambas as proteínas avaliadas.

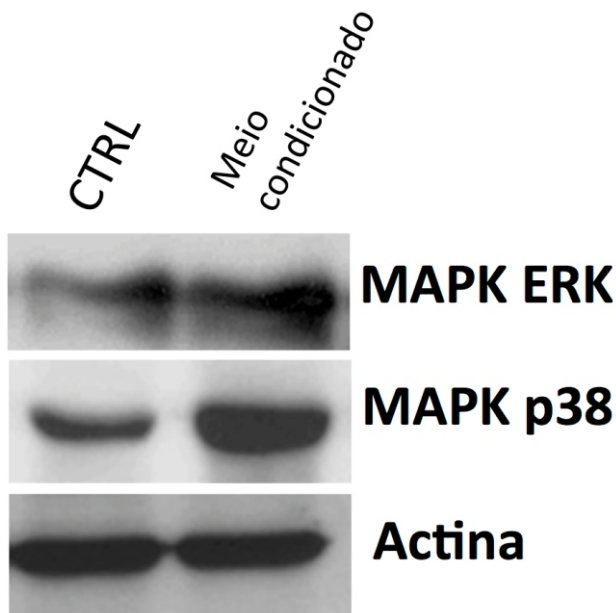


Figura 2 - MAPK ERK e p38 são super-expressas em resposta ao meio condicionado de implantes dentários. Após as células serem tratadas com o meio condicionado e meio convencional (CTRL) por 24 horas, as células foram lisadas com tampão de lise adequado e as proteínas dosadas pelo Kit da Bio-Rad. Após a mesma concentração de proteínas foram aplicadas (60 g/lane) em gel de bis-Acrilamida 10%. Após corrida sob voltagem constante de 100V, as proteínas foram transferidas em membrana de PVDF por 45 minutos, sob corrente de 400 mA. As membranas foram especificamente incubadas com anticorpo primário (1:1000) contra as proteínas em questão por 12 horas a 4°C. Após, estas membranas foram lavadas e incubadas com Anticorpo secundário (1:5000) por 1 hora a temperatura ambiente. Após, foram incubadas com ECL (Pierce) e reveladas em filmes de raio-x utilizando revelador e fixador Kodac em sala escura.

A principal via para regulação do crescimento e da diferenciação celular é através das cascatas envolvendo as Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs), as quais transmitem sinais da membrana plasmática ao núcleo a partir da ligação de hormônios, fatores de crescimento (estímulo extracelular) ou outros fatores a receptores específicos na membrana plasmática. MAPKs são proteínas serina/treonina quinases que fosforilam vários substratos citoplasmáticos e nucleares, culminando na regulação da expressão de genes que codificam várias proteínas, incluindo c-Jun, c-myc, ATF2, SAP-1 e MEF2C^{16,22}. As MAPKs pertencem a uma grande família que inclui a quinase c-Jun N-terminal ou proteína quinase ativada por estresse (JNK/SAPK), a proteína quinase ativada por sinal extracelular (ERK) e a subfamília da MAPK p38, a qual está envolvida na resposta ao estresse desencadeado por vários

fatores ambientais. Em osteoblastos, nosso grupo mostrou que a MAPK p38 estava envolvida durante mecanismos intracelulares de adesão celular e sua ativação contribuiu para o rearranjo do citoesqueleto³³.

CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados apontam para um mecanismo intracelular guiado por implantes a base de titânio que orquestra a sinalização necessária para sobrevivência e proliferação celulares.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a SIN Sistema de Implante pela doação dos implantes avaliados nesta pesquisa e CNPq pelo apoio financeiro. WFZ é bolsista produtividade CNPq.

REFERÊNCIAS

- Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1: review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004;17(5):536-43.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Proteintyrosinephosphatases in the humangenome. *Cell*. 2004;117(6):699-711.
- Anamika K, Srinivasan N. Comparative kinomics of Plasmodium organisms: unity in diversity. *ProteinPeptLett*. 2007;14(6):509-17.
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000;21(7):667-81.
- Aranda B, Achuthan P, Alam-Faruque Y, Armean I, Bridge A, Derow C, et al. The IntAct molecular interaction database in 2010. *NucleicAcids Res*. 2010;38(Databaseissue):D525-31.
- Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DD, Ferreira CV, Bertran CA. A simple method for enhancing cell adhesion to hydroxyapatite surface. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(12):1411-3.
- Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DD, Ogeda TL, Ferreira CV, Bertran CA. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;78(2):177-84.
- Buser D, Brogini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*. 2004;83(7):529-33.
- Ferreira CV, Justo GZ, Souza AC, Queiroz KC, Zambuzzi WF, Aoyama H, et al. Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-

- molecule derivatives. *Biochimie*. 2006;88(12):1859-73.
10. Gemini-Piperni S, Milani R, Bertazzo S, Peppelenbosch M, Takamori ER, Granjeiro JM, et al. Kinome profiling of osteoblasts on hydroxyapatite opens new avenues on biomaterial cell signaling. *BiotechnolBioeng*. 2014;111(9):1900-5.
 11. Gemini-Piperni S, Takamori ER, Sartoretto SC, Paiva KB, Granjeiro JM, Oliveira RC, et al. Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: a closer look at cell-biomaterial interface. *Arch BiochemBiophys*. 2014;561:88-98.
 12. Hunter T, Cooper JA. Protein-tyrosine kinases. *AnnuRevBiochem*. 1985;54:897-930.
 13. Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, Perez OD, Bruserud Ø, Gjertsen BT. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell*. 2004;118(2):217-28.
 14. Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, et al. STRING 8 - a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D412-6.
 15. Johnson SA, Hunter T. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods*. 2005;2(1):17-25.
 16. Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;16(5):281-98.
 17. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298(5600):1912-34.
 18. Milani R, Ferreira CV, Granjeiro JM, Paredes-Gamero EJ, Silva RA, Justo GZ, et al. Phosphoproteome reveals an atlas of protein signaling networks during osteoblast adhesion. *J CellBiochem*. 2010;109(5):957-66.
 19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J ImmunolMethods*. 1983;65(1-2):55-63.
 20. Puckett SD, Lee PP, Ciombor DM, Aaron RK, Webster TJ. Nanotextured titanium surfaces for enhancing skin growth on transcutaneous osseointegrated devices. *Acta Biomater*. 2010;6(6):2352-62.
 21. Sohn SH, Jun HK, Kim CS, Kim KN, Chung SM, Shin SW, et al. Biological responses in osteoblast-like cell line according to thin layer hydroxyapatite coatings on anodized titanium. *J Oral Rehabil*. 2006;33(12):898-911.
 22. Song JH, Kim JH, Park S, Kang W, Kim HW, Kim HE, et al. Signaling responses of osteoblast cells to hydroxyapatite: the activation of ERK and SOX9. *J Bone Miner Metab*. 2008;26(2):138-42.
 23. van der Eerden BC, Teti A, Zambuzzi WF. Bone, a dynamic and integrating tissue. *ArchBiochemBiophys*. 2014;561:1-2.
 24. Webster TJ, Ejiófor JU. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials*. 2004;25(19):4731-9.
 25. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 2000;21(17):1803-10.
 26. Xenarios I, Rice DW, Salwinski L, Baron MK, Marcotte EM, et al. DIP: the database of interacting proteins. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):289-91.
 27. Zambuzzi WF, Bonfante EA, Jimbo R, Hayashi M, Andersson M, Alves G, et al. Nanometer scale titanium surface texturing are detected by signaling pathways involving transient FAK and Src activations. *PLoS One*. 2014;9(7):e95662.
 28. Zambuzzi WF, Bruni-Cardoso A, Granjeiro JM, Peppelenbosch MP, Carvalho HF, Aoyama H, et al. On the road to understanding of the osteoblast adhesion: cytoskeleton organization is rearranged by distinct signaling pathways. *J Cell Biochem*. 2009;108(1):134-44.
 29. Zambuzzi WF, Coelho PG, Alves GG, Granjeiro JM. Intracellular signal transduction as a factor in the development of "smart" biomaterials for bone tissue engineering. *BiotechnolBioeng*. 2011;108(6):1246-50.
 30. Zambuzzi WF, Ferreira CV, Granjeiro JM, Aoyama H. Biological behavior of pre-osteoblasts on natural hydroxyapatite: a study of signaling molecules from attachment to differentiation. *J Biomed Mater Res A*. 2011;97(2):193-200.
 31. Zambuzzi WF, Milani R, Teti A. Expanding the role of Src and protein-tyrosine phosphatases balance in modulating osteoblast metabolism: lessons from mice. *Biochimie*. 2010;92(4):327-32.
 32. Zambuzzi WF, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. Modulation of Src activity modulation by low molecular weight protein tyrosine phosphatase during osteoblasts differentiation. *CellPhysiolBiochem*. 2008;22(5-6):497-506.
 33. Zambuzzi WF, Yano CL, Cavagis AD, Peppelenbosch MP, Granjeiro JM, Ferreira CV. Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. *Mol CellBiochem*. 2009;322(1-2):143-50.