



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



**Mariana Aline Cominotte**

**Avaliação de diferentes tratamentos de superfícies de Tc<sub>p</sub> e Ti-6Al-4V-ELI:  
análises físicas, químicas e biológicas *in vitro***

**Araraquara**

**2020**



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



**Mariana Aline Cominotte**

**Avaliação de diferentes tratamentos de superfícies de T1cp e Ti-6Al-4V-ELI:  
análises físicas, químicas e biológicas *in vitro***

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

**Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**

**Araraquara**

**2020**

Cominotte, Mariana Aline

Avaliação de diferentes tratamentos de superfícies de TiCp e Ti-6Al-4V-ELI: análises físicas, químicas e biológicas in vitro / Mariana Aline Cominotte.-Araraquara: [s.n.], 2020.

72 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia  
Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1. Teste de materiais    2. Implantes dentários  
3. Osseointegração    I. Título

**Mariana Aline Cominotte**

**Avaliação de diferentes tratamentos de superfícies de TiCp e Ti-6Al-4V-ELI:  
análises físicas, químicas e biológicas *in vitro***

**Comissão julgadora**

**Tese para obtenção do grau de Doutorado em Odontologia**

Presidente e orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2º Examinador Claudemiro Bolfarini

3º Examinador Thallita Pereira Queiroz

4º Examinador Eduardo Hochuli Vieira

5º Examinador Leandro Fernandes

Araraquara 30 de março de 2020

## **DADOS CURRICULARES**

### **Mariana Aline Cominotte**

**NASCIMENTO** 31 de Maio de 1988 - Araraquara / SP

**FILIAÇÃO** Carlos Alberto Cominotte

Kelly Kassia Ferreira Cominotte

2008 – 2012: Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

2014 – 2016: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

2015 – 2017: Curso de Especialização em Periodontia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

2016 – atual: Curso Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

*Dedico este trabalho aos amores de minha vida: Mamãe, Papai, Alexandre Cominotte e Alexandre Carmargo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me abençoado durante todos os momentos desta etapa em minha vida, e por ter colocado em meu caminho pessoas especiais com as quais convivi durante o doutorado.

Aos meus pais Kelly e Carlos, meu irmão Alexandre, pessoas maravilhosas que amo incondicionalmente, que me apoiaram e incentivaram durante todos os momentos de minha vida. Sem vocês não seria possível chegar até aqui.

Ao meu amor, Alexandre, pelo apoio, incentivo, atenção, e compreensão, durante os momentos bons e ruins desta fase. Meu melhor amigo, parceiro e marido, sua presença foi indispensável para mim.

Às pessoas especiais que convivem e compartilham comigo todos momentos, minha avó e tia Lili, Arary, Janaina, Josaine, Mariângela, Estevam, Mariana, Stefan e Jackeline. É um prazer conviver com vocês, obrigada pelo carinho.

À amiga Fernanda Florian, companheira, que compartilhou comigo todos os momentos de minha vida acadêmica e pessoal, sendo eles bons ou ruins. Obrigada pela agradável convivência e pelos ensinamentos. Sou muito grata pela amiga que a pós-graduação me deu.

Ao meu orientador Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, por todas as oportunidades, ensinamentos, pela confiança, respeito e parceria, sou muito grata e me sinto muito abençoada pela convivência, você é responsável por todo meu desenvolvimento profissional. Muito obrigada por sua dedicação e paciência.

À Luana Carla Pires Verzola, colega e amiga, que me auxiliou nos primeiros passos laboratoriais da pós-graduação. Em cada etapa, em cada trabalho realizado e concluído, existe um pedacinho seu Lu. Deixo aqui um agradecimento muito especial à você, obrigada pela parceria e pelo companheirismo.

Às colegas de trabalho, pela parceria e companheirismo, no dia a dia da rotina do laboratório, Flavia Gomes Matos, Natalie Aparecida Rodrigues Fernandes e Laura Andréa González Maldonado, muito obrigada pela convivência agradável.

Aos professores da FOAr-UNESP que contribuíram para meu aprimoramento profissional, Profa. Dra. Daniela Zandim, Prof. Dr. Carlos Rossa, Profa. Dra. Silvana Orrico e Prof. Dr. José Eduardo Sampaio, obrigada pelo carinho e por todos os ensinamentos.

Agradeço à todas as pessoas que pertencem à família Marcantonio, Carolina e Camila, pela amizade e parceria, Prof. Dr Elcio Marcantonio Junior, por todas as oportunidades que me proporcionou durante o doutorado, e em especial à Profa. Dra. Adriana Chérico Marcantonio, pelo incentivo, acolhimento e acompanhamento dos meus primeiros passos na área científica, sou muito grata e me sinto abençoada por ter compartilhado meus dias e meus trabalhos com você. Para mim, exemplo de pessoa e profissional.

Às funcionárias da FOAr-UNESP, em especial Isabela, Suleima, Claudia e Lene, as quais sou muito grata pela convivência e por toda ajuda para o desenvolvimento de meu trabalho.

Ao CNPq:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, em reconhecimento ao auxílio financeiro prestado para processo 140193/2017, que possibilitou a realização das etapas de minha pesquisa.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.



*“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”. Charlie Chaplin*

Cominotte MA. Avaliação de diferentes tratamentos de superfícies de Ticp e Ti-6Al-4V-ELI: análises físicas, químicas e biológicas *in vitro* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## RESUMO

A qualidade do tecido ósseo representa condição “sine qua non” para a estabilidade e longevidade de implantes biomédicos. Diante de fatores sistêmicos relacionados à insuficiência e/ou má qualidade do tecido ósseo peri-implantar, o desenvolvimento de superfícies de titânio com atividade osteogênica é amplamente incentivado na área da implantodontia. Sendo assim, este Estudo avaliou diferentes formas de tratamentos da superfície das amostras de titânio comercialmente puro (Ticp) e titânio liga 6Alumínio-4Vanádio, que visam o favorecimento dos mecanismos celulares de osteogênese. Este estudo foi dividido em 2 capítulos. Na publicação 1 as amostras foram divididas em 3 grupos de acordo com os tratamentos (Grupo 1: Titânio comercialmente puro – MS; Grupo 2: Tratamento com NaOH - AES; Grupo 3: Tratamento com NaOH associado à deposição de Estrôncio (Sr) – Sr-AES. Os resultados demonstraram que as superfícies dos Grupos 2 e 3 apresentaram-se mais rugosas, quando avaliadas em perfilômetro, e mais hidrofílicas em teste de molhabilidade, em comparação às do Grupo 1 ( $p < 0.05$ , One Way Anova). As células em contato com a superfície do Grupo 3 apresentaram espraiamento celular mais evidente, em comparação aos Grupos 1 e 2, indicando que a adição do estrôncio às amostras foi favorável ao desenvolvimento das células precursoras ósseas. Na publicação, as amostras foram divididas em 3 grupos de acordo com os diferentes tratamentos. Grupo A: titânio comercialmente puro – Ticp; Grupo B: Ti-6Al-4V com jateamento e tratamento duplo-ácido (HCl e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); Grupo C: Ti-6Al-4V com jateamento e tratamento ácido-básico (NaOH + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Os testes físicos, por meio de avaliações com microscopia confocal à laser, demonstraram que as amostras do Grupo B apresentaram-se mais rugosas, se comparadas ao Grupo A e C, seguidas pelo Grupo C, se comparadas às amostras do Grupo A. As células sobre a superfície do Grupo B demonstraram-se mais viáveis que as células dos Grupos A e C ( $p < 0.05$ , Two Way Anova), avaliadas por meio do teste de Alamar Blue®. A adesão celular, analisada por meio das imagens de MEV, demonstraram resultados semelhantes para ambos os grupos. Entretanto, a morfologia e o espraiamento celular, analisadas por meio das imagens de fluorescência direta, assim como, a expressão gênica de proteínas relacionadas à via osteogênica, demonstraram-se favoráveis para os Grupos B e C, se comparadas, ao Grupo A. De modo geral, este trabalho demonstra que o jateamento e/ou tratamento químico com substâncias ácidas e básicas, para o aumento da rugosidade superficial, e a adição de estrôncio com potencial osteogênico, visando à maturação celular, foram eficientes, observando-se a correlação direta destas modificações, com os processos de adesão, viabilidade e maturação celular, visto que, nas superfícies mais rugosas, e nas superfícies com adição de estrôncio, as células demonstram estágios mais avançados de diferenciação osteoblástica.

**Palavras-chave:** Teste de materiais. Implantes dentários. Osseointegração.

Cominotte MA. Evaluation of different surface treatments of cpTi and Ti-6Al-4V-ELI: physical, chemical and biological analysis in vitro. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## **ABSTRACT**

The quality of bone tissue represents a “sine qua non” condition for the stability and longevity of biomedical implants. Faced with systemic factors related to insufficiency and / or poor quality of peri-implant bone tissue, the development of titanium surfaces with osteogenic activity is encouraged in the implantology. Thus, this study evaluated different forms of surface treatments of samples of commercially pure titanium (Ticp) and titanium alloy 6Aluminium-4Vanadium, which aim to favor the cellular mechanisms of osteogenesis. This study was divided into 2 chapters. In Publication 1 the samples were divided into 3 groups according to the treatments (Group 1: Commercially pure titanium - MS; Group 2: Treatment with NaOH - AES; Group 3: Treatment with NaOH associated with the deposition of Strontium (Sr) - Sr -AES The results showed that the surfaces of Groups 2 and 3 were rougher when evaluated using a profilometer, and more hydrophilic in a wettability test, compared to Group 1 ( $p < 0.05$ , One Way Anova). The cells in contact with the Group 3 surface showed more evident cell spread, compared to Groups 1 and 2, indicating that the addition of strontium to the samples was favorable to the development of bone precursor cells. groups according to different treatments Group A: commercially pure titanium (Ticp); Group B: Ti-6Al-4V with blasting and double-acid treatment (HCl and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); Group C: Ti-6Al-4V with blasting and acid-base treatment (NaOH + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Physical tests, using evaluations with laser confocal microscopy, showed that Group B samples were more rough when compared to Group A and C, followed by Group C, compared to Group A samples. on the surface of Group B, they were more viable than the cells of Groups A and C ( $p < 0.05$ , Two Way Anova), evaluated by means of the Alamar Blue® test. Cell adhesion, analyzed using SEM images, showed similar results for both groups. However, cell morphology and spread, analyzed by means of direct fluorescence images, as well as the gene expression of proteins related to the osteogenic pathway, proved to be favorable for Groups B and C, if compared, to Group A. in general, this work demonstrates that blasting and/or chemical treatment with acidic and basic substances, to increase surface roughness, and the addition of strontium with osteogenic potential, aiming at cell maturation, were efficient, observing the direct correlation of these modifications, with the processes of adhesion, viability and cell maturation, since, on the rougher surfaces, and on the surfaces with the addition of strontium, the cells demonstrate more advanced stages of osteoblastic differentiation.

**Keywords:** Materials testing. Dental implants. Osseointegration.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>09</b>
<b>1.1 Titânio comercialmente puro.....</b>	<b>09</b>
<b>1.2 Titânio liga 6Al-4V (Ti-6Al-4V) .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3 Modificação superficial dos biomateriais .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Jateamento das superfícies .....</b>	<b>13</b>
<b>1.5 Tratamento químico das superfícies .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Tratamento hidrotermal .....</b>	<b>14</b>
<b>1.7 Bioativação da superfície de Ti com estrôncio – Sr .....</b>	<b>15</b>
<b>1.8 Características das modificações superficiais .....</b>	<b>16</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>3 PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Publicação 1 .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Publicação 2 .....</b>	<b>37</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICE A - Metodologia Detalhada da Publicação 1.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE B - Metodologia Detalhada da Publicação 2.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na contextualização atual da produção de próteses ortopédicas e implantes dentários, o titânio e suas ligas, apresentam altas taxas de sucesso com relação à interação e biocompatibilidade celular, e por apresentarem estes pontos positivos, o titânio e suas ligas, são considerados materiais de escolha para a confecção dos implantes dentários<sup>1,2,3</sup>.

Segundo Branemark<sup>4</sup>, a osseointegração é caracterizada pela adesão e crescimento do tecido ósseo ao redor dos implantes dentários. Entretanto, alguns fatores sistêmicos que causam má qualidade e deficiência óssea, na região periimplantar, podem causar falhas na osseointegração dos implantes dentários, influenciando diretamente a longevidade destes tratamentos<sup>5</sup>. Para que o sucesso a longo prazo destes implantes seja atingido, é necessário que se forme uma unidade mecânica estável, entre a interface osso e implante<sup>6</sup>.

Os metais mais utilizados na confecção de implantes comercializados atualmente são o titânio comercialmente puro (Ticp), a liga Ti-6Al-4V (titânio-6alumínio-4vanádio) e liga Ti-13Nb-13Zr (titânio-nióbio-zircônio)<sup>2,1</sup>. O titânio comercialmente puro exibe características desejáveis como alta relação resistência/densidade, boa resistência à corrosão e biocompatibilidade. A adição de outros elementos, como alumínio, vanádio, molibdênio, é realizada com intuito de conferir uma melhora nas propriedades mecânicas e químicas, para que estes materiais suportem as cargas mastigatórias, e se relacionem favoravelmente com o tecido osso ao seu redor<sup>7,8</sup>.

### 1.1 Titânio comercialmente puro

O titânio comercialmente puro (Ticp) possui grau de pureza em torno de 98 % a 99,5%, sendo que a quantidade das impurezas está relacionada à presença dos elementos químicos: O, C, Fe, N e H, que podem alterar as propriedades físicas deste metal<sup>9</sup>.

O Ti e suas ligas se destacam por suas propriedades como alta resistência à corrosão, baixa densidade e baixo módulo de elasticidade quando comparados com outros materiais metálicos, além de excelente biocompatibilidade. Implantes de Ti provocam uma reação mínima no tecido onde é inserido; geralmente não levam a um processo inflamatório, nem desencadeiam reações alérgicas<sup>10</sup> e são classificados como bioinertes<sup>11</sup>.

Uma das desvantagens do Ticp é apresentar baixa resistência ao desgaste, inviabilizando seu uso como superfície articular<sup>12</sup>. Por isso, o Ticp é preferível em condições onde a resistência à corrosão é a característica de maior importância em relação às propriedades mecânicas<sup>13</sup>. Isto explica seu vasto uso em componentes para cirurgias neurológicas, cardiovasculares, maxilofaciais, em alguns tipos de cirurgias ortopédicas, como por exemplo em componentes de fixação de próteses de quadril, e em cirurgias orais<sup>10</sup>. Na Odontologia, o Ti é o material de primeira escolha na fabricação de implantes (parafuso e pilar), coroas, pontes e sobredentaduras<sup>14</sup>.

Com relação às suas vantagens, o Ti possui uma alta resistência à corrosão devido ao fato de reagir com o oxigênio do meio, formando uma camada de óxido estável e não porosa em sua superfície, com espessura variando entre 2 a 7 nm<sup>15</sup>. Esta camada pode ser espessada e modificada por diversos processamentos que melhoram sua resistência à corrosão e podem promover alterações em sua superfície, aumentando seu grau de biocompatibilidade<sup>16</sup>. Além disto, este material demonstra uma rápida osseointegração, promovendo um selamento do implante com as estruturas periimplantares adjacentes, diminuindo a probabilidade de invasão bacteriana<sup>17</sup>.

## 1.2 Titânio liga 6Al-4V (Ti-6Al-4V)

A liga Ti-6Al-4V é utilizada desde 1960, e vem substituindo gradualmente o Ticp, por apresentar maior resistência mecânica. Em temperatura ambiente, o titânio comercialmente puro apresenta estrutura hexagonal representada como fase  $\alpha$ , transformando-se em uma estrutura cúbica, denominada fase  $\beta$ , quando submetida à elevadas temperaturas, por volta de 883°C<sup>18,19</sup>. Esta temperatura de transformação pode ser alterada por meio da adição de elementos químicos que caracterizam o tipo de liga. As propriedades mecânicas das ligas de Ti dependem da relação quantitativa e qualitativa das fases  $\alpha$  e  $\beta$  do metal.

O titânio  $\alpha$  é muito suscetível à deformação e ao superaquecimento, o que produz uma estrutura distorcida<sup>20</sup>. Pesquisas que estudam o aperfeiçoamento das ligas de Ti para a Implantodontia, visam as ligas do tipo  $\beta$ , que possui características como baixo módulo de elasticidade, assemelhando-se mais ao módulo de elasticidade óssea, maior resistência mecânica e à corrosão e melhor resposta tecidual quando comparadas com ligas tipo  $\alpha+\beta$ <sup>20</sup>. Quando elementos de liga são adicionados ao titânio, estes elementos exercem efeito sobre a transformação das fases  $\alpha$  e  $\beta$ . Os

elementos adicionados que aumentam ou mantêm a faixa de temperatura de estabilidade da fase  $\alpha$  são chamados de  $\alpha$ -estabilizadores, e são eles alumínio, estanho e zircônio. Os elementos adicionados que estabilizam a fase  $\beta$  são chamados de  $\beta$ -estabilizadores, eles incluem o molibdênio, vanádio e ferro<sup>20, 21</sup>.

A liga Ti-6Al-4V-ELI (intersticiais extra baixos – extra low interstitials) apresenta duas fases em sua composição, fase  $\alpha$  e fase  $\beta$ . A incorporação do Al e do V nesta liga, tem como objetivo tornar o titânio puro, passível de tratamentos térmicos, a fim de se alcançar um módulo de elasticidade mais compatível com as características ósseas<sup>12</sup>.

Os primeiros implantes dentários foram confeccionados sem nenhum tipo de tratamento da superfície, apenas eram realizados processos de usinagem, que produziam superfícies de aspecto liso. Estes implantes pioneiros foram utilizados durante muito tempo, até começarem os estudos sobre os processos que texturizavam as superfícies, buscando-se melhoras nos processos de osseointegração, visando a estabilidade por longos períodos de tempo.

Atualmente a maioria dos processos de fabricação que envolvem os implantes metálicos, geram camadas superficiais de óxidos muito irregulares, e pouco favoráveis aos processos de osseointegração. Por este motivo, vários estudos propõem modificações nas superfícies dos materiais, com o objetivo de melhorar a biocompatibilidade destas estruturas, auxiliando os processos celulares.

Um material biocompatível deve exibir bons resultados de resistência à corrosão, e características que favoreçam à osseointegração<sup>12</sup>. Um implante sem adequada biocompatibilidade pode ter sua funcionalidade reduzida ou anulada, ou ainda induzir respostas indesejadas pelos tecidos do hospedeiro, gerando desconforto e dor ao paciente, até que ocorra a perda destas estruturas.

### **1.3 Modificação superficial dos biomateriais**

A modificação superficial dos biomateriais assume um papel fundamental para amparar os processos envolvidos nos mecanismos celulares da osteogênese. Estudos *in vivo* demonstram os efeitos positivos da modificação da superfície de Ti sobre a osseointegração dos implantes endósseos<sup>13,22</sup>, e estudos *in vitro* com cultura celular tem ressaltado a influência das propriedades físico-químicas da superfície de Ti nas propriedades celulares que favorecem a osteogênese<sup>23,10</sup>.

As superfícies de titânio podem ser modificadas pelos processos químicos e mecânicos, também denominados de subtração ou adição. Os processos de subtração podem ser realizados por meio dos tratamentos de eletropolimento, polimento mecânico, jateamento, condicionamento ácido, básico e oxidação anódica. Já os processos de adição, são caracterizados pelo revestimento das superfícies com algumas substâncias, a exemplo: hidroxiapatitas (HA) e outros compostos a base de Cálcio e Fosfato (apatitas); além da técnica de plasma-spray, que também é caracterizada pela incorporação de substâncias aos metais.

O Quadro 1 abaixo demonstra os principais tipos de tratamentos superficiais, com objetivo de funcionalização das superfícies dos biomateriais que visam favorecer a osseointegração.

**Quadro 1** - Estratégias para funcionalização das superfícies dos biomateriais, visando a osseointegração

<b><i>Estratégia</i></b>	<b><i>Efeito</i></b>	<b><i>Limitação</i></b>
Aumento da rugosidade – processos de subtração (Ra em escala $\mu\text{m}$ )	Melhora a osseointegração devido a maior retenção mecânica	Também pode aumentar a adesão bacteriana
Revestimentos inorgânicos (Ca/P/apatitas)	Potencial osteocondutor e osteoindutor	Também podem aumentar a adesão bacteriana
Revestimentos orgânicos (proteínas/peptídeos)	Potencial osteocondutor e osteoindutor	Também podem aumentar a adesão bacteriana
Revestimentos antiadesivos	Inibe a adesão bacteriana	A adesão de células eucarióticas também é comprometida
Revestimentos bactericidas	Morte bacteriana ou inibição de sua adesão	A adesão, função e viabilidade das células eucarióticas podem ser comprometidas

Fonte: Adaptado de Mas-Moruno et al.<sup>1</sup> (2019).



#### 1.4 Jateamento das superfícies

Para aumentar a rugosidade superficial dos biomateriais, pode-se utilizar um tratamento com jateamento de partículas, caracterizado por lançar em alta velocidade, partículas contra as superfícies. O material de jateamento deve ser quimicamente estável, biocompatível e não deve prejudicar a osseointegração dos implantes<sup>25</sup>.

Atualmente muitos estudos são desenvolvidos com a finalidade de criar superfícies rugosas em implantes de Ti visando favorecer a osseointegração<sup>26,27</sup>. Estas superfícies rugosas são usualmente obtidas por meio do jateamento com alumina ( $Al_2O_3$ ) e dióxido de titânio ( $TiO_2$ ), sendo na maioria das vezes, acompanhado pelos tratamentos por ataque ácido. As partículas provenientes do jateamento são incorporadas na superfície do implante, e posteriormente a este processamento utilizam-se ácidos com o objetivo de remoção destas impurezas, que podem interferir nos processos de osseointegração<sup>12</sup>.

Le Guehennec et al.<sup>25</sup> em 2008, observaram o crescimento de células *in vitro* sobre superfícies de TiCP que foram jateadas com alumina, e demonstraram a possibilidade da obtenção de bioatividade com esse tipo de modificação superficial. Zhou et al.<sup>6</sup> (2010), demonstraram o efeito do jateamento da superfície de Ti, associada à utilização do ácido fluorídrico, sobre a osseointegração e ancoragem de implantes de Ti. O tratamento induziu um aumento na rugosidade da superfície em escala nanométrica, favorecendo a osseointegração e a ancoragem mecânica.

#### 1.5 Tratamento químico das superfícies

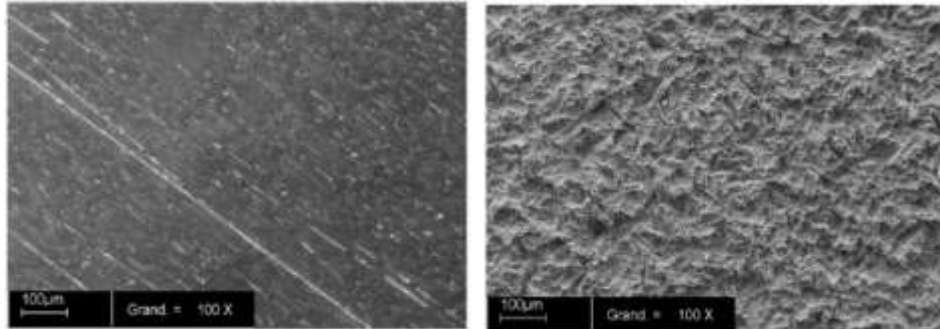
A modificação das superfícies por meio do tratamento químico pode ser realizada com ataque de substâncias ácidas e substâncias alcalinas.

A utilização de ácidos e bases na superfície de implantes de titânio são empregados com o objetivo de alterar a rugosidade (Figura 1), composição da superfície, bem como a molhabilidade/energia superficial<sup>25</sup>. Dentre os principais ácidos utilizados atualmente nos estudos, encontram-se: clorídrico, sulfúrico, fluorídrico e fosfórico, além da mistura dos mesmos, pois quando associados demonstram o favorecimento da osseointegração<sup>28</sup>.

As substâncias de caráter alcalino também promovem alterações na topografia superficial (Figura 2), sendo a mais utilizada, o hidróxido de sódio (NaOH). Esta base promove reações químicas na camada superficial do  $TiO_2$ , causando sua dissolução parcial. As partículas negativas desta camada combinam-se com partículas alcalinas

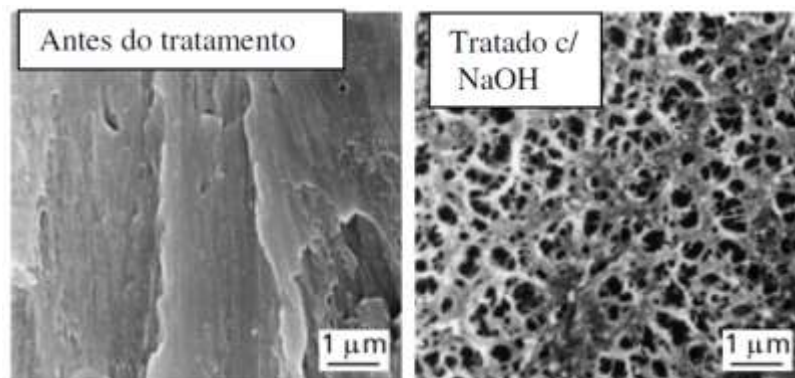
da solução de NaOH, formando uma camada de titanato de sódio sobre a superfície de Ti, demonstrando-se bioativa em contato com solução *SBF* – *simulated body fluid*<sup>29</sup>.

**Figura 1** - Superfície de Ticp e Ticp com tratamento de ácido Sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). Magnificação de 100x, barra com 100  $\mu m$



Fonte: Le Guehenec et al.<sup>25</sup> (2008).

**Figura 2** - Superfície de Ticp e Ticp com tratamento de NaOH



Fonte: Adaptado de Kim et al.<sup>30</sup> (1997).

## 1.6 Tratamento hidrotermal

O tratamento hidrotermal ou hidrotérmico (EQHT), é amplamente utilizado para aumentar a solubilidade das partículas adicionadas às soluções, facilitando a cristalização destas partículas amorfas, sobre determinadas superfícies, em condições de temperatura e pressão atmosférica controladas.

Um estudo realizado por Pang et al.<sup>17</sup> (2018), avaliou o efeito da superfície de Ti tratada com HA por meio do método EQHT, sobre a morfologia, diferenciação, proliferação e citotoxicidade de osteoblastos em cultura celular. O estudo demonstrou que este método produziu uma estrutura superficial nano-ordenada, mais favorável à osteogênese, em comparação à superfície de Ti usinada, verificando-se maior

expressão dos genes *Alp*, *Runx2*, *Col1a1* e *Ocn* nos grupos com revestimento de HA nos períodos de 7, 14 e 21 dias.

Recentemente, Tsimbouri et al.<sup>31</sup> (2016), avaliaram o potencial osteogênico e antimicrobiano de superfícies de Ti submetidas a diferentes padrões de tratamento hidrotérmico, e demonstraram que em determinada temperatura e tempo de tratamento, ocorreu maior estímulo de células osteoblásticas, com redução na colonização bacteriana, devido à nanoestrutura superficial formada.

Deste modo, este tipo de tratamento apresenta-se atualmente como um processamento viável para ser utilizado na modificação de superfícies de Ti.

### **1.7 Bioativação da superfície de Ti com estrôncio – Sr**

Atualmente, os bisfosfonatos são muito utilizados devido à eficiência no tratamento das patologias ósseas<sup>1,32</sup>. Estes compostos são reguladores endógenos da mineralização óssea, atuando na inibição da ativação de células osteoclásticas, estabilizando a perda óssea ocasionada por doenças metabólicas<sup>5</sup>.

Contudo, os bisfosfonatos, apresentam forte ligação química, com alta permanência no tecido ósseo<sup>33</sup>, devido a isto, atualmente estes medicamentos são relacionados aos casos de fraturas ósseas, lesões renais e gastrointestinais<sup>34</sup>, apresentando também correlação com o aumento das taxas de risco de osteonecrose<sup>35</sup> e câncer de esôfago<sup>8</sup>. Por este motivo, estes fármacos não são utilizados em favorecimento aos procedimentos odontológicos<sup>36</sup>. Alguns estudos atuais têm observado efeitos positivos com relação à utilização dos bisfosfonatos em áreas de baixa qualidade óssea; porém, estes resultados estão sendo alcançados com baixas concentrações destes medicamentos, por meio dos protocolos com efeito local, aplicando-os previamente na região que receberá os implantes, ou incorporando-os às superfícies dos implantes<sup>37</sup>. Porém, devido aos efeitos colaterais e riscos sistêmicos dos bisfosfonatos, a busca de outras drogas com efeito osteoindutor ou que bloqueie a reabsorção óssea tem sido pesquisada, com destaque a medicamentos à base de estrôncio.

O estrôncio (Sr) é um elemento químico que pertence ao grupo dos metais alcalinos-terrosos, estando localizado logo abaixo do cálcio na tabela periódica, e devido a isto, este elemento químico assemelha-se com o cálcio. Apresenta absorção intestinal, eliminação renal, e alta afinidade pela hidroxiapatita, incorporando-se ao

tecido ósseo e dentes<sup>38</sup>, e ao contrário dos bisfosfonatos, os medicamentos à base de estrôncio, agem em conjunto nos mecanismos de formação e reabsorção óssea<sup>39</sup>.

Em um estudo realizado por Fernandes et al.<sup>40</sup> (2019), o efeito do estrôncio em fibroblastos gengivais foi avaliado para elucidar o papel desta substância sobre as interações entre os implantes dentários e a gengiva. Os autores demonstraram que o estrôncio diminuiu a apoptose celular, e aumentou a atividade destas células com relação à fixação celular nos pilares próticos.

Zhou et al.<sup>6</sup>, em 2019 utilizou células de medula óssea (BMSC's) para avaliação dos efeitos do estrôncio sobre a adesão inicial, proliferação e diferenciação adipogênica, e confirmaram a influência do estrôncio sobre o metabolismo celular, verificando aumento na adesão e proliferação das BMSC's, bem como, a diminuição do estresse oxidativo das células, e a inibição da adipogênese, sendo estas características favoráveis à osseointegração.

Li et al.<sup>39</sup>, em 2010, avaliaram a administração de ranelato de estrôncio e instalação de implantes em ratas osteoporóticas, e demonstraram aumento nas taxas de fixação e volume ósseo ao redor dos implantes, inferindo que sua abordagem é eficaz na osseointegração de implantes em organismos osteoporóticos.

Buehler et al.<sup>41</sup>, em 2001, administraram diferentes doses de ranelato de estrôncio (100; 275; 750 mg/kg/dia) em macacos, durante um período de 6 meses, demonstrando resultados favoráveis com relação à diminuição da reabsorção óssea, mantendo deste modo a formação óssea, com efeito expressivo apenas para a máxima concentração.

Por estes resultados favoráveis do metabolismo ósseo, associado à utilização do estrôncio, surgem novas possibilidades de incorporação deste composto à medicamentos, suplementos, e superfícies de biomateriais com a finalidade de atuação nas patologias ósseas.

### **1.8 Características das modificações superficiais**

É demonstrado na literatura, que os processos de texturização superficial dos implantes dentários, são responsáveis pela modificação da rugosidade, produzindo superfícies de caráter macro, micro e nanométrico. Estes três tipos de escala atuam diretamente nas respostas celulares, podendo modular os eventos que envolvem a osseointegração.

As superfícies denominadas de usinadas, são confeccionadas por meio do lixamento superficial de suas estruturas. Este processo mecânico confere ranhuras às superfícies de com tamanhos entre 20  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ <sup>28</sup>.

O processamento por jateamento das superfícies, promovem rugosidades de caráter macrométrico, enquanto que, o condicionamento com substâncias ácidas ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ) das superfícies, promovem alterações de caráter micrométrico, com tamanhos entre 1,0  $\mu\text{m}$  a 10,0  $\mu\text{m}$ , e o tratamento com substâncias alcalinas ( $\text{NaOH}$ ) promovem nanorugosidades com tamanhos abaixo de 100 nm<sup>30,42,43</sup>.

Dentro de todo o contexto abordado, observamos a importância de estudos que avaliem e elucidem as repostas das células, quando há o contato direto com diferentes tipos de superfícies de implantes, visto que, vários são os parâmetros que podem influenciar, na adesão, proliferação e maturação celular, conseqüentemente otimizando a osseointegração e restringindo possíveis falhas biológicas.

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi de avaliar, por meio de análises físicas, químicas e biológicas, as superfícies de Ticp e Ti-6Al-4V-ELI, após receberem diferentes tratamentos para a modificação superficial, segundo os itens descritos abaixo:

- a) Tratamento químico das amostras de Ticp com NaOH associado ou não com a deposição superficial de hidróxido de estrôncio octahidratado [ $\text{Sr}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ] (Publicação1),
- b) Jateamento das amostras de Ti-6Al-4V-ELI com partículas de  $\text{TiO}_2$ , seguidos pelos tratamentos químicos: ácido-básico com ácido fosfórico e hidróxido de sódio ( $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{NaOH}$ ), ou duplo-ácido com ácido clorídrico e ácido fosfórico ( $\text{HCl} + \text{H}_3\text{PO}_4$ ) (Publicação 2).

### 2.1 Objetivos específicos

- a) Caracterizar fisicamente e quimicamente os discos de Ticp, analisando-se a composição, alteração da rugosidade, ângulo de contato e molhabilidade (publicação 1). E caracterizar fisicamente os discos de Ti-6Al-4V-ELI, modificados por tratamentos químicos e físicos superficiais, avaliando-se os resultados de rugosidade e área efetiva superficial (publicação 2).
- b) Caracterizar biologicamente os discos de Ticp e Ti-6Al-4V-ELI, avaliando-se as respostas celulares de pré-osteoblastos em contato direto com as diferentes superfícies propostas nas publicações 1 e 2, analisando-se a adesão, proliferação, viabilidade celular, e o potencial de mineralização da matriz óssea.

### 3 PUBLICAÇÕES

A execução deste trabalho, resultou em 2 publicações, divididas em: Publicação 1 e Publicação 2, correspondentes às sessões seguintes, que compõem esta tese de doutorado.

#### 3.1 Publicação 1\*

**Functionalization and bioactivation of titanium surface by chemical treatment and hydrothermal deposition of strontium improves physical, chemical and biological properties.**

Cominotte MA, Santana LCL, de Foggi C, Matos FG, Assis M, Vergani C, Vaz LG, Longo E, Cirelli JA.

#### ABSTRACT

The functionalization and bioactivation of titanium (Ti) surfaces have been suggested to improve osseointegration of dental implants installed in regions that present poor bone quality caused by the influence of systemic diseases or local factors, which act directly on bone metabolism. In this study physical, chemical and biological properties of a new bioactive Ti surface was evaluated. Implant discs were divided into 3 groups according to their surface treatment; Group MS - Commercially pure titanium with machined surface; Group AES - Alkaline Etched Surface; Group Sr-AES - Alkaline Etched Surface associated with the deposition of Strontium (Sr). The results showed that the alkaline chemical treatment with NaOH was effective in promoting superficial modifications favorable to osseointegration in commercially pure Ti. The Groups MS and AES showed hydrophilic surface characteristics and Sr-AES Groups showed amphiphilic surface characteristics. In addition, AES and Sr-AES Groups showed higher free surface energy compared to the MS samples ( $p < 0.05$ , Two Way Anova). There was showed an increase in the proliferation of MC3T3-E1 cells cultured on the MS, AES and Sr-AES surfaces ( $p > 0.05$ , Two Way Anova). However, microbiological analysis revealed a tendency to increase in the adhesion of *Streptococcus aureus* to the AES and Sr-AES, compared to the MS Ti surfaces ( $p > 0.05$ , Two Way Anova). The alkaline treatment with NaOH promoted an increase hydrophilicity in cpTi samples. In addition, the hydrothermic treatment carried out with the Sr (OH)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O solution was efficient to incorporate the Sr particles on the cpTi samples. Thus, both the increase in hydrophilicity and the incorporation of Sr in the cpTi samples of this study, favored the biological processes of cellular osteogenesis of MC3T3-E1 cells.

**Keywords:** Titanium. Strontium. Dental Implants. Osteoblasts. *Staphylococcus aureus*.

### 1 INTRODUCTION

---

\* Artigo formatado segundo as normas do periódico *Materials Science and Engineering C*, para o qual pretendemos submeter esta publicação.

Titanium (Ti) and its alloys have been widely used in the manufacture of orthopedic prostheses and dental implants due to its physical and biocompatible properties. Titanium has satisfactory fatigue and corrosion resistance, in addition to present lower elastic modulus when compared to other metals [34, 5]. Besides, Ti-based materials show higher chemical reactivity, which entails the formation of an adherent oxide layer on its surface, in order to protect it against the corrosion of the metal.

It is well known that the success of osseointegration relies on the biochemical interactions between bone cells and dental implants surface [2, 18]. In this context, the physicochemical properties of the implant surface can influence bone cells metabolism and proliferation [20,32]. Several treatments can be performed in order to enhance the Ti surface properties, either altering its morphology, as well as its crystalline structure or composition [15]. Modifications in the Ti surface can be obtained through additive or subtractive treatments, for instance: plasma, ion deposition, sandblasting, laser beam irradiation, alkaline or acid etch treatment [26], heat treatment [16], by means of hydrothermal reaction [31], or through the association of two or more methods [13].

Surface treatment with potentially corrosive hydroxides and with a high degree of ionization, such as sodium (NaOH) and potassium hydroxides (KOH), represents a subtractive method, which promotes micro- and nano-roughness (by removing part of the substrate) [8, 15], in addition to providing greater hydrophilicity to the Ti surface [4].

The deposition of particles on the titanium surface, carried out by the hydrothermal method, can be considered an addition reaction. This treatment is characterized by the immersion of the samples in chemical solutions, with controlled temperature and atmospheric pressure [6]. This procedure favors the deposition of bioactive minerals, such as calcium phosphate [31], magnesium [29], silver and strontium (Sr) [7].

Recent studies have demonstrated favorable outcome of Ti surfaces treated with Sr deposition by hydrothermal method on mesenchymal cells [33] and osteoblasts [11] proliferation. On the other hand, despite that rougher surfaces provide better bone-implant contact [25], this attribute can also facilitate the adhesion of microorganisms [20], especially *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), which has preferential adhesion to titanium-6aluminum-4vanadium (Ti-6Al-4V) [3].



Previous studies have reported the antibacterial effect of Sr-incorporated hydroxyapatite nano-particles against *Escherichia coli* and *S. aureus* [24], and the dose-dependent effect of Sr-loaded bioactive glass to reduce the growth rate of periodontal pathogens, namely *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) and *Porphyromonas gingivalis* (Pg) [17].

However, more studies are needed to evaluate the Strontium ability to induce osteoblastic activity and reduce the action of microorganisms after its incorporation on Ti surface, aiming to optimize the osseointegration process and restrict the risk of biological failures, in dental or orthopedic implants. In this study, we proposed a new bioactive Ti surface functionalized with NaOH alkaline chemical treatment followed by Sr incorporation by hydrothermal method. Physical, chemical and biological properties were evaluated.

## 2 MATERIAL AND METHODS

Commercially pure titanium discs were used, divided into 3 groups, according to the surface treatment received: Group: MS - Commercially pure titanium (cpTi) with machined surface; Group AES - Alkaline Etched Surface and Group Sr –AES - Alkaline Etched Surface associated with the deposition of Strontium (Sr).

### 2.1 Samples preparation

A cpTi cylindrical bar (ASTM Grade 2; Realum, Brazil), 11,11 mm in diameter and 100 cm in length, was used to obtain 1.5 mm thick discs. The discs were progressively polished with silicon carbide (400, 600, 800, 1,200, 1,500 and 2,500), under abundant irrigation with 92.8% ethanol, until the cpTi surface assumed a mirrored aspect. For the AES treatment, samples were washed in ultrasound, with ethanol and deionized water and subsequently soaked in sodium hydroxide (NaOH; 5M), at 60 °C, for 24 h [7]. After this treatment, samples for the Sr-AES group were subjected to the alkaline-hydrothermal treatment [3] with strontium hydroxide [Sr (OH)<sub>2</sub>.8H<sub>2</sub>O; 60 mM], in steel autoclave, at 121 °C (± 2 °C) and 1.0 to 1.5 Kgf / cm<sup>2</sup>, for 1 h.

Before the analyzes, all the samples were placed inside a laminar flow, 50 mm from a germicidal lamp (30 W, Philips, Germany), and irradiated with ultraviolet light (UV-C;  $\lambda = 254$  nm) for a period of 1 hour, from both the sides for decontamination [19].

## 2.2 Physical and chemical characterization

**2.2.1 Surface morphology and roughness** - A scanning electron microscope (SEM-FEG; JEOL 7500F, Japan) was used to analyze the morphological characteristics of the samples (3 samples per group). The surface roughness of the samples was analyzed using a profilometer (Mitutoyo SJ 400, Tokyo, Japan) with a 5  $\mu\text{m}$  diameter diamond tipped probe with reading speed of 0.5 mm, 0.01  $\mu\text{m}$  resolution, 0.8 mm cut-off length and 2.4 mm cross-section [10]. Four readings were performed on each specimen (4 samples per group), and the parameters Ra (mean arithmetic roughness) and Rz (maximum height of the roughness profile) were evaluated.

**2.2.2 Contact angle and superficial free energy**- The sample surfaces were analyzed on a goniometer (Ramé-Hart, USA), using water (polar) and diiodomethane (nonpolar), by the sessile drip method [9]. A drop of 3  $\mu\text{L}$  was dispensed on the surface of Ti, and the contact angle formed between the Ti surface and the external surface of the droplet was determined by means of 20 measurements performed every 0.001s. This procedure was determined using the DROPimage CA software (Ramé-Hart, USA), was repeated 9 times.

**2.2.3 Chemical composition** - The analysis by dispersive energy spectroscopy (EDS) coupled to the SEM-FEG, was used to determine, qualitatively, the chemical elements present on the surface of the samples. X-ray excited photoelectron spectroscopy (XPS) was used to analyze the electrical state of the chemical elements detected by EDS (3 samples per group).

## 2.3 Cell and microbial characterization

**2.3.1 Cell culture** - The biocompatibility evaluations of the different Ti surfaces were made by analyzing the behavior of the MC3T3-E1 pre-osteoblast cell line (BCRJ, Brazil), grown in direct contact with the samples. The cells were seeded on the disks at a density of  $2 \times 10^4$  cells/ml of culture medium. The samples were stored in 24 well plates and maintained in  $\alpha$ -MEM culture medium in proportions of 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ascorbic acid and 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, at 37 ° C, in a humidified atmosphere containing 5%

CO<sub>2</sub> and 95% atmospheric air. After 24 hours, the titanium discs were transferred to a new well, to avoid that cells grown in the plastic surface interfered in the results. Each of the next described experiments was performed in triplicate (n = 3) in 3 independent repetitions.

**2.3.2 Cell viability** - The cells were incubated with the Alamar Blue<sup>®</sup> (Invitrogen, USA) reagent, diluted to 10% in  $\alpha$ -MEM culture medium, maintained for 4 h, at 37 ° C in humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and 95% of atmospheric air. Subsequently, 150  $\mu$ L of conditioned Alamar Blue<sup>®</sup> (Invitrogen, USA) was transferred to 96-well plates (Corning, USA). Measurements of the Alamar Blue<sup>®</sup> supernatant were performed on a spectrophotometer (Synergy H1, BioTek <sup>™</sup>, USA) at 570/600 nm, in the periods of 1, 3, 7, 10 and 14 days of cell culture.

**2.3.3 Cell proliferation and spreading** - The cells were cultured on the Ti discs for a period of 3 days, then fixed by solutions of 2% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, USA) diluted in pure  $\alpha$ -MEM (Gibco) and 2% glutaraldehyde (Sigma, USA) diluted in buffer 0.1M cacodylate (Sigma-Aldrich, USA). After cell fixation, the samples were washed with PBS (phosphate buffered saline - Gibco) and dehydrated in increasing concentrations of ethyl alcohol. The drying of the Ti discs was done in a vacuum dissector receiving, at the end of the processing, the deposition of a 6 nm gold layer for analysis in a scanning electron microscope - SEM (JEOL JSM-6610LV, Japan). Five micrographs of each sample were used for the analysis.

**2.3.4 Cell adhesion and morphology evaluation** - For the evaluation of cell adhesion and spreading, osteoblastic precursor cells were grown on the samples, and evaluated in the periods of 2 h and 4 h, by means of direct fluorescence assays with phalloidin conjugated to the Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes), for analysis of the cell cytoskeleton and with the 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride dye (DAPI, Molecular Probes) for nuclear labeling. Five micrographs of each sample were used for the analysis.

**2.3.5 S. aureus culture** -To prepare the inoculum, the strain *S. aureus* (ATCC 33591) was plated in Petri dishes (Corning<sup>®</sup>) containing Mueller Hinton agar medium (Himedia, Mumbai, India) and incubated at 37 ° C for 48 h. Then, an elevation of the newly

cultivated strain was transferred to flasks containing 20 mL of Trypticase Soy Broth culture medium (TSB; Sigma, St Louis, MO, USA) for cell growth at 37 ° C for 21 h. The bacterial cells of the resulting culture were harvested, centrifuged with PBS (Gibco®) at 4,000×g for 5 min, and resuspended in TSB medium. The optical density of the inoculum was determined and standardized by means of a spectrophotometer at a concentration of  $1 \times 10^7$  cells/mL.

**2.3.6 CFU/mL Counting Method** - After removing the non-adherent cells, the Ti discs were transferred to a Falcon tube containing 10 mL of PBS and then vigorously shaken for 1 min, and resuspend the adhered cells. Cell suspensions were subjected to serial dilutions ( $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ ), and a 25  $\mu$ L aliquot of each dilution was plated on Mueller Hinton agar (Himedia), in duplicate. The cells were incubated at 37 ° C for 48 h and then the number of colonies was counted and expressed as CFU/mL.

**2.3.7 *S. aureus* adhesion evaluation** - 2 mL aliquots of the *S. aureus* suspension, standardized at  $1 \times 10^7$  cells/mL, were plated to the surface of the cpTi discs and incubated at 37 ° C in an orbital shaker at 75 rpm. After the initial adhesion period, (90 min), the non-adherent cells were removed by washing with 2 mL of PBS, and the initial adhesion of *S. aureus* was determined by counting colony forming units per milliliter. (CFU/mL). The samples of Ti in TSB culture medium constituted the negative control of the experiment. The experiments were carried out in duplicate, on three independent occasions.

**2.3.8 Morphology, colonization and viability of *S. aureus*** - After the initial adhesion period and washing with PBS, the spread of the microorganism was evaluated in SEM. Cell viability was determined using the BacLight Live / Dead Viability Kit (Invitrogen®), using a laser fluorescence confocal microscope (CLSM; Zeiss LSM 800). In this assay, viable and non-viable cells were represented by green and red staining markings, respectively.

## 2.4 Statistical analysis

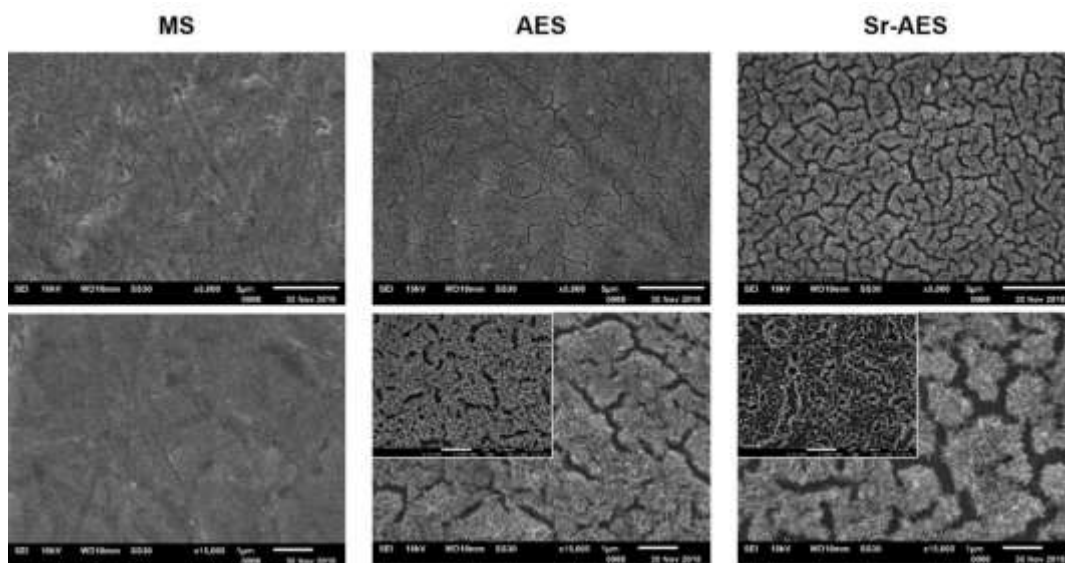
The data obtained in the physical, chemical, biological and microbiological analyzes were submitted to the Shapiro-Wilk test to analyze adherence to the normality curve. The Bartlett test was used to determine the assumption of homogeneity of

variance in the data. Respecting the normality criteria, the data were submitted to analysis by the Two-Way ANOVA method, and Tukey's multiple comparison test. All statistical tests were performed with the Prism 7 software (GraphPad Software, USA), considering the significance level of 5%.

### 3 RESULTS

#### 3.1 Physical and chemical analysis

SEM analysis showed that NaOH treatment was efficient for the production of a nanostructured Ti surface, with macro and micro fissures, with interlaced connection networks. Hydrothermal treatment with Sr  $[(OH)_2 \cdot 8H_2O]$  at 60 mM, carried out under constant temperature and pressure conditions promoted the increase of fissures and networks of Ti created by the treatment with NaOH (Fig. 1).



**Fig. 1.** SEM images showing the characteristics of the Ti surfaces of the MS (control), AES and Sr-AES Groups, in magnifications of 5.000X and 15.000X.

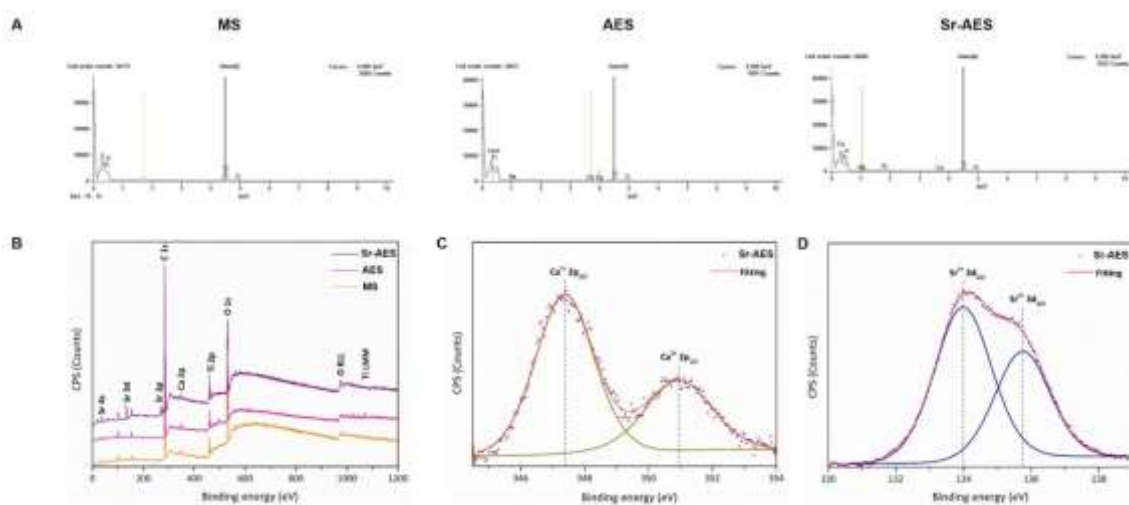
The analysis of the contact angle of the samples with water and diiodomethane demonstrated the predominance of hydrophilic characteristics of the MS Group, superhydrophilic of the AES Group, and amphiphilic on the surfaces of the Sr-AES samples. The treatment with NaOH provided an increase in the hydrophilicity of the cpTi surface, showing no change after the addition of strontium. The free energy of the surface was represented by the values of the geometric and harmonic means, being higher for the surfaces AES and Sr-AES, in comparison with the Group MS. The roughness parameters (Ra and Rz) showed similar values between the MS, AES and

Sr-AES surfaces. The results obtained after the analyzes in goniometer and profilometer are described in Table 1.

**Table 1.** The values show the average of the roughness parameters, contact angle, and free surface energy. The symbols  $\gamma_S^p$ ,  $\gamma_S^d$  e  $\gamma_S$  indicate, respectively, the values of the polar, dispersive and total free surface energy (mN / m) components.  $\pm$  SD, standard deviation ( $p > 0,05$  – Two-Way Anova).

Groups	Roughness ( $\mu\text{m}$ )		Contact Angle ( $\pm$ SD)		Surface Free Energy (mN/m)					
					Geometric Media			Harmonic Media		
					$Ra$	$Rz$	Water	Diodomethane	$\gamma_S$	$\gamma_S^d$
MS	0.07	0.51	59.01 ( $\pm$ 0.36)	35.31 ( $\pm$ 0.13)	54.07	41.88	12.18	60.04	42.24	17.79
AES	0.06	0.49	16.46 ( $\pm$ 0.18)	42.89 ( $\pm$ 0.14)	73.51	38.13	35.38	76.57	38.82	37.75
Sr-AES	0.07	0.50	22.20 ( $\pm$ 0.12)	24.02 ( $\pm$ 0.14)	75.21	46.50	28.71	80.03	46.58	33.45

The analysis by EDS confirmed the presence of the chemical elements Ti and Oxygen (O) on the surface of all Groups. Sr peaks were observed on the surface of Sr-AES samples. In addition, the presence of calcium was detected on the surface of the AES and Sr-AES Groups. The XPS confirmed the presence of all elements found in the EDS. Sr 4s, Sr 3d and Sr 3p peaks were observed on the surface of the Sr-AES Group. All surfaces showed similar Ca 2p peaks. The deconvolution of the Sr 3d ( $\text{Sr}^{+2} 3d_{5/2}$ ) and Ca 2p ( $\text{Ca}^{+2} 2p_{2/3}$ ) peaks indicates the probable transformation of  $\text{TiO}_2$  into  $\text{SrTiO}_3$  and the presence of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ), respectively. Figure 2 illustrates the results of chemical analyzes carried out on Ti surfaces.



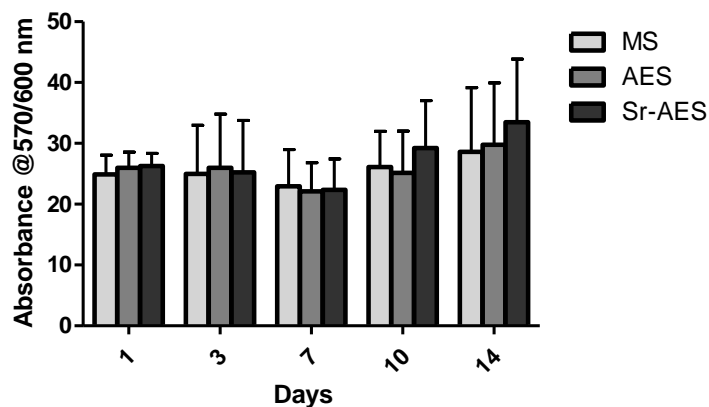
**Fig.2.** Elementary analysis of the Ti surfaces of the MS, AES and Sr-AES Groups, performed using EDS and XPS. The graphs in Image A show the elements identified after analysis in

EDS. Image B shows the electrochemical state of the elements C, O, Ti, Ca and Sr. The graphs of images C and D show the deconvolution of the Ca 2p and Sr 3d peaks, respectively.

## 3.2 Cell analysis

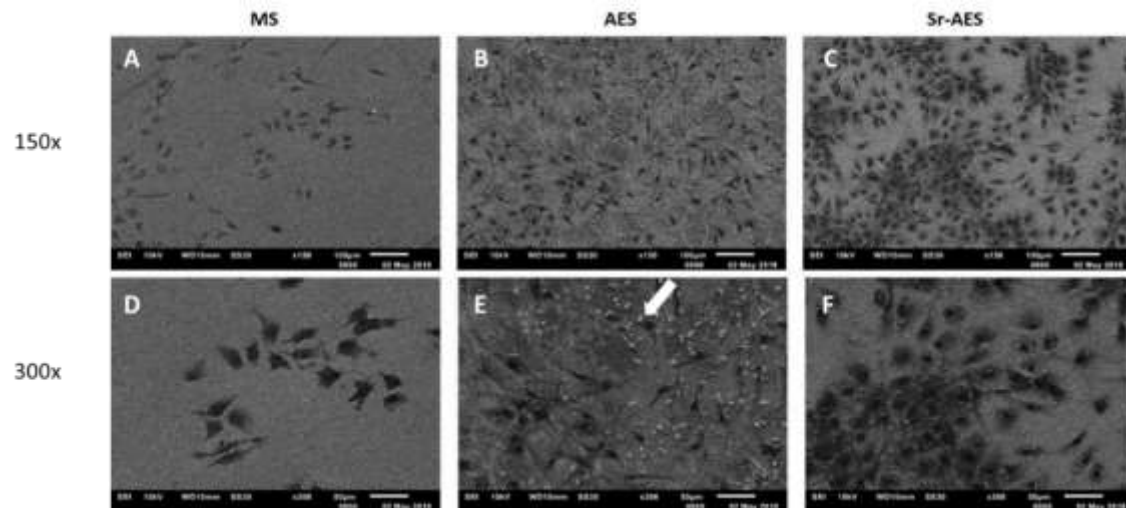
### 3.2.1 Adhesion, Proliferation, Morphology and Spreading of MC3T3-E1 Cells

The results obtained from the Alamar Blue® test showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) in the MS, AES and Sr-AES Groups at 14-day cell culture period. (Fig. 3).



**Fig. 3.** Absorbance values after incubation of MC3T3-E1 cells with Alamar Blue®, which indicates cell viability and proliferation in the periods of 1, 3, 7, 10 and 14 days of culture, in MS (Machined Surface), AES (Alkaline Etched Surface) and Sr-AES (Strontium Alkaline Etched Surface) Groups. The bars in the graph indicate the average absorbance and the vertical lines the standard deviation. ( $p > 0.05$ , Two-Way Anova).

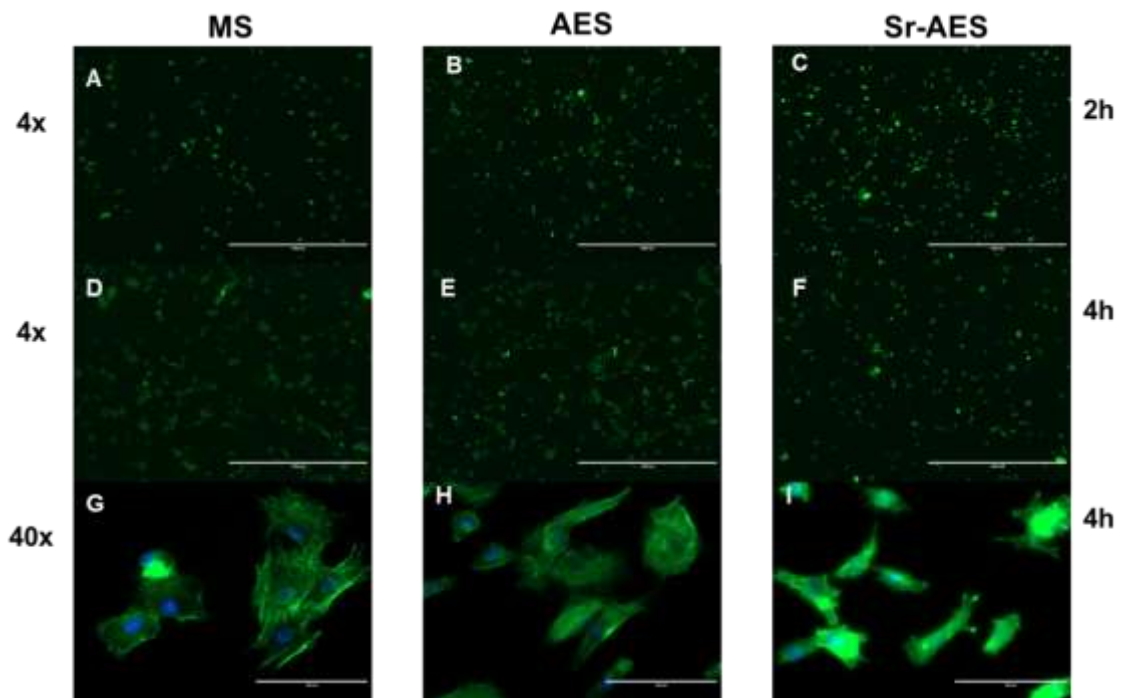
The analysis of the SEM images demonstrated an increase in the proportion of cells present on the surfaces of the AES and Sr-AES Groups in comparison to the MS Group. Additionally, in the AES Group, the chemical treatment with NaOH seems to have favored the precipitation of hydroxyapatite on its surface (Fig. 4E). Furthermore, the hydrothermal treatment with Sr favored the conglomeration of MC3T3-E1 cells, organized in “islands” form on the Ti surface of the Sr-AES Group (Fig. 4C and 4F).



**Fig. 4.** SEM images illustrate the spread of osteoblasts grown on different Ti surfaces, in magnifications of 150X and 300X. The white arrow indicates precipitation of phosphates on cp-Ti surface.

The analysis of the images obtained from the fluorescence electron microscope (Auto imaging system - EVOS FL®) showed, at 2 hours, a greater proportion of osteoblasts adhered to the surfaces of the AES and Sr-AES Groups, compared to the MS group. At 4 h, osteoblasts cultured on Ti discs treated with Sr showed a fusiform aspect, with the presence of cytoplasmic extensions, while cells cultured on discs of the MS and AES Groups showed a polygonal aspect and few cytoplasmic projections (Fig. 5).



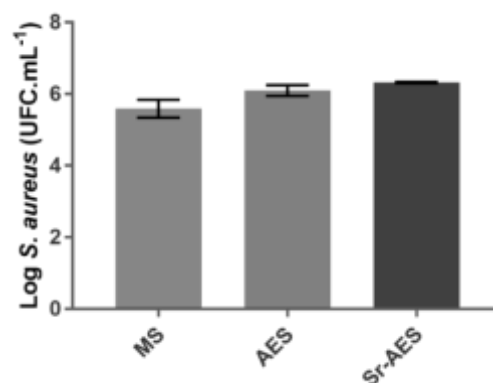


**Fig. 5.** MC3T3-E1 cells stained with DAPI (blue) and phalloidin (green). Images A, B and C show cell adhesion after the 2 h incubation period, at 4x magnification. Images D, E and F, show cell adhesion after the 4 h incubation period, at 4 x magnification. The G, H and I images illustrate the cell morphology after the 4 h adhesion period, in 40x magnification.

### 3.3 Microbiological analysis

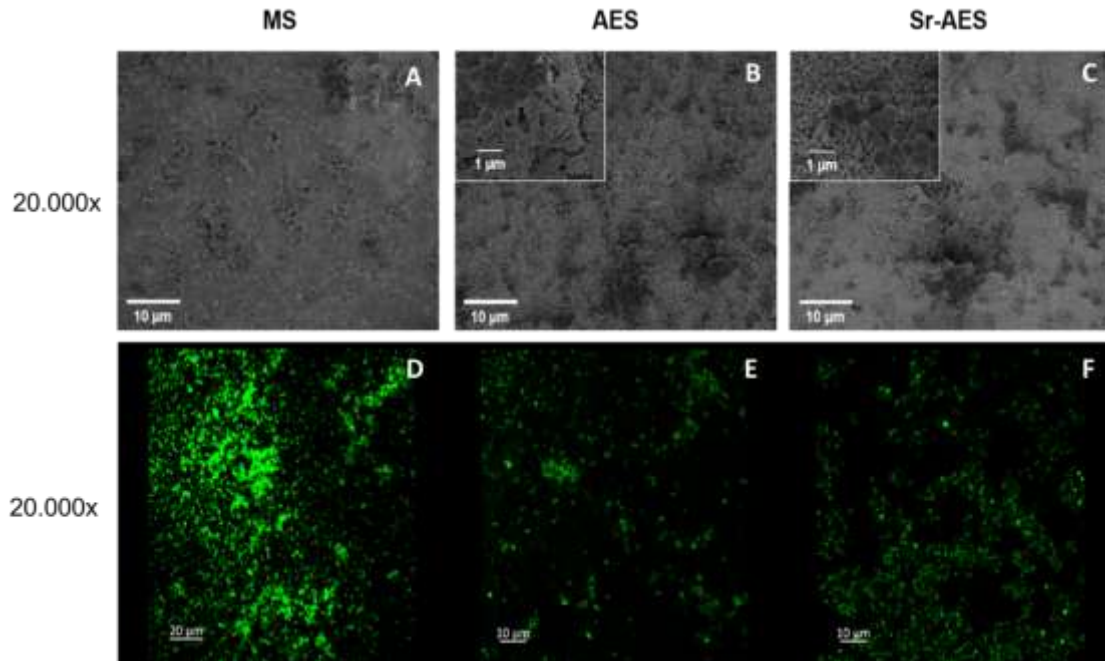
#### 3.3.1 Adhesion, Colonization and Viability of *S. aureus*

The physicochemical properties of the different Ti surfaces did not affect the initial adhesion of *S. aureus*. The SEM images showed that the spread of *S. aureus* over the Ti surface occurred in a similar way in the MS, AES and Sr-AES Groups (Fig.6).



**Fig. 6.** CFU/mL count after the initial adhesion phase of *S. aureus* to the Ti surfaces of the MS, AES and Sr-AES Groups.

In addition, the presence of viable cells indicates that no surface treatment has antimicrobial activity against *S. aureus* (Fig. 7).



**Fig.7.** The A-F images illustrate, respectively, the spreading and viability of *S. aureus* evaluated after the adhesion phase (90 min), on the Ti surfaces of the MS, AES and Sr-AES Groups.

#### 4 DISCUSSION

This study demonstrated that the functionalization and bioactivation of Ti surface by means of alkaline attack with NaOH (AES Group), or by alkaline hydrothermal treatment with NaOH and  $\text{Sr}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  (Sr-AES Group) were able to improve physical and chemical properties of the Ti surfaces, which favored pre-osteoblast proliferation and differentiation, without affecting bacterial adhesion and colonization.

Understanding the topographic characteristics of Ti surfaces is fundamental for determining factors that may influence the osseointegration of endosseous implants [12, 14, 21, 30]. Surfaces that present a rough topography demonstrate greater cell adhesion [1]. Osteoblasts can distinguish differences between roughness levels on similar surfaces, indicating a correlation of sensitivity of these cells with the organization, amplitude and morphology of the roughness [27]. Additionally, treatments that alter the roughness of the Ti surfaces directly affect the expression of genes related to the differentiation of osteoblasts [22].

The micrographs obtained by SEM showed Ti surfaces of the AES and Sr-AES Groups nano-structured with macro and micro-cracks more evident in the Sr-AES Group. This characteristic occurs by favoring the precipitation process of  $\text{TiO}_2$ , in alkaline NaOH solution, during the hydrothermal treatment in an autoclave [27, 28]. Additionally, the XPS analysis found the presence of Sr (Sr 3d) on the surface of the Sr-AES Group samples indicating the transformation of  $\text{TiO}_2$  into  $\text{SrTiO}_3$ , after the hydrothermal treatment with  $\text{Sr}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  [6, 10]. The presence of carbon (C 1s) and calcium (Ca 2p) were also verified, indicating a possible contamination of the Ti surface with hydrocarbons and calcium carbonate, which may have occurred during the handling of the samples [15, 23].

The analysis of the contact angle showed hydrophilic, superhydrophilic and amphiphilic characteristics of the Ti surfaces of the MS, AES and Sr-AES Groups, respectively. These results are in agreement with the study conducted by Shi et al. [27] which demonstrated the influence of the surface treatment with 5M NaOH on the hydrophilicity of the Ti surface. In addition, the hydrothermal treatment of the surface of Ti previously treated with NaOH resulted in additional small change in relation to the degree of hydrophilicity of the substrate.

Sr overdoses can cause cellular cytotoxicity [36], however, the amount of Sr incorporated in the samples of this study, did not demonstrate toxicity for MC3T3-E1 preosteoblasts (Fig.3). The incorporation of Sr to the Ti substrate may slightly favor protein binding, forming a more uniform surface layer [37]. The cells in contact with this protein layer profile, adhere to the surface covered with Sr in a more uniform way, demonstrating greater spreading and cellular proximity [35], as illustrated by Fig. 4C, compared to Fig. 4A. The superficial treatment of Ti with NaOH, also promotes the formation of a superficial layer called sodium titanate, which favors protein binding, influencing the cell adhesion events, observed in Fig. 4B, compared to Fig. 4A.

As previously described the quality of cell adhesion is directly dependent, on the previous binding of proteins that support cell adhesion to the substrate of biomaterials. Initially, the cells attach themselves to the surfaces through the presence of positive and negative charges, present in the surface layer of the substrates, from that moment on, the cells adhere, proliferate and differentiate. The quality of this initial connection will influence cell differentiation [38]. Cells with more elongated aspects, spindle-shaped, with emission of cytoplasmic extensions, demonstrate more advanced cell maturation stages (Fig. 5I), when compared to cells with polygonal characteristics (Fig.

5G and 5H) [39]. Thus, we observed that the addition of Sr to the Ticp substrate of this study favored the maturation of preosteoblasts (MC3T3-E1) in osteoblasts.

Concomitantly to favoring osseointegration, studies with modification of Ti surface has also focused on the antimicrobial activity, with a strategic purpose for potential prevention of peri-implant infections. With the same purpose, the present study evaluated the adhesion and viability of *S. aureus* grown on the different Ti surface treatments. Unlike the results obtained by Liu et al. [17] and Ravi et al. [24] who reported the antibacterial action of strontium against aerobic and anaerobic pathogens, the strontium treated surface (Sr-AES) was not able to inhibit the adhesion or viability of *S. aureus*.

It is possible that the free surface energy of the samples from the AES and Sr-AES groups influenced the adhesion of *S. aureus* to the Ti substrate. The divergences between the results obtained in the current study and those reported by the previous studies [17, 24] can be explained by the differences in methods. While Liu et al. [17] and Ravi et al. [24] evaluated the antibacterial action of strontium incorporated into hydroxyapatite nanoparticles and strontium particles incorporated into bioactive glass against *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*, respectively, the present study was the first to evaluate the cellular events of *S. aureus* grown on Ti surfaces loaded with strontium.

In summary, the present results should be interpreted with caution. This study showed a tendency towards the favorable effects of Sr-loaded Ti surfaces in the MC3T3-E1 cells activity. In addition, some limitations should be acknowledged and taken into consideration for results interpretation: the dynamic of strontium release from the Ti surface was not evaluated in this study and particles of strontium are withdrawn whenever culture medium is changed. Furthermore, mechanistic studies should be developed to better understand the role of Sr-loaded Ti surfaces at the molecular level of osteoblastic differentiation; which might influence the initial phase of osseointegration.

## 5 CONCLUSION

In conclusion, the bioactivation of Ti surface with Sr by hydrothermal method promoted morphological changes in MC3T3-E1 cells, compatible with more advanced

stages of cell differentiation, suggesting a positive effect of that implant surface in the maturation of pre-osteoblasts into osteoblasts. However, the chemical treatment favored an increase in the proportion of viable *S. aureus* which was not affected by Sr addition, demonstrating no antimicrobial properties of the new surface.

## REFERENCES

- [1] K. Anselme, M. Bigerelle, Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion, *Acta Biomater.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2004.11.009>.
- [2] A. Barfeie, J. Wilson, J. Rees, Implant surface characteristics and their effect on osseointegration, *Br. Dent. J.* (2015). <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2015.171>.
- [3] E. Barth, Q.M. Myrvik, W. Wagner, A.G. Gristina, In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials, *Biomaterials.* (1989). [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(89\)90073-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(89)90073-2).
- [4] C.M. Bhadra, V. Khanh Truong, V.T.H. Pham, M. Al Kobaisi, G. Seniutinas, J.Y. Wang, S. Juodkazis, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Antibacterial titanium nano-patterned arrays inspired by dragonfly wings, *Sci. Rep.* (2015). <https://doi.org/10.1038/srep16817>.
- [5] A. Biesiekierski, J. Lin, Y. Li, D. Ping, Y. Yamabe-Mitarai, C. Wen, Investigations into Ti-(Nb,Ta)-Fe alloys for biomedical applications, *Acta Biomater.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.12.010>.
- [6] S. Chaguetmi, S. Achour, L. Mouton, P. Decorse, S. Nowak, C. Costentin, F. Mammeri, S. Ammar, TiO<sub>2</sub> nanofibers supported on Ti sheets prepared by hydrothermal corrosion: Effect of the microstructure on their photochemical and photoelectrochemical properties, *RSC Adv.* (2015). <https://doi.org/10.1039/c5ra13848e>.
- [7] H. Cheng, W. Xiong, Z. Fang, H. Guan, W. Wu, Y. Li, Y. Zhang, M.M. Alvarez, B. Gao, K. Huo, J. Xu, N. Xu, C. Zhang, J. Fu, A. Khademhosseini, F. Li, Strontium (Sr) and silver (Ag) loaded nanotubular structures with combined osteoinductive and antimicrobial activities, *Acta Biomater.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.046>.
- [8] E. Conforto, D. Caillard, L. Müller, F.A. Müller, The structure of titanate nanobelts used as seeds for the nucleation of hydroxyapatite at the surface of titanium implants, *Acta Biomater.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.05.001>.
- [9] J.M. Cordeiro, T. Beline, A.L.R. Ribeiro, E.C. Rangel, N.C. da Cruz, R. Landers, L.P. Faverani, L.G. Vaz, L.M.G. Fais, F.B. Vicente, C.R. Grandini, M.T. Mathew, C. Sukotjo, V.A.R. Barão, Development of binary and ternary titanium alloys for dental implants, *Dent. Mater.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.013>.
- [10] C.C. de Foggi, A.L. Machado, C.A. Zamperini, D. Fernandes, A.F. Wady, C.E. Vergani, Effect of surface roughness on the hydrophobicity of a denture-base

- acrylic resin and *Candida albicans* colonization, *J. Investig. Clin. Dent.* (2016). <https://doi.org/10.1111/jicd.12125>.
- [11] Z. Gong, H. Cheng, M. Zhang, X. Liu, Y. Zeng, K. Xiang, Y. Xu, Y. Wang, Z. Zhu, Osteogenic activity and angiogenesis of a SrTiO<sub>3</sub> nano-gridding structure on titanium surface, *J. Mater. Chem. B.* (2017). <https://doi.org/10.1039/c6tb02329k>.
- [12] H.E. Götz, M. Müller, A. Emmel, U. Holzwarth, R.G. Erben, R. Stangl, Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants, *Biomaterials.* (2004). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.002>.
- [13] M. Kawashita, N. Endo, T. Watanabe, T. Miyazaki, M. Furuya, K. Yokota, Y. Abiko, H. Kanetaka, N. Takahashi, Formation of bioactive N-doped TiO<sub>2</sub> on Ti with visible light-induced antibacterial activity using NaOH, hot water, and subsequent ammonia atmospheric heat treatment, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.017>.
- [14] D. Lakstein, W. Kopelovitch, Z. Barkay, M. Bahaa, D. Hendel, N. Eliaz, Enhanced osseointegration of grit-blasted, NaOH-treated and electrochemically hydroxyapatite-coated Ti-6Al-4V implants in rabbits, *Acta Biomater.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.033>.
- [15] J. Li, K. Zhang, Y. Xu, J. Chen, P. Yang, Y. Zhao, A. Zhao, N. Huang, A novel coculture model of HUVECs and HUASMCs by hyaluronic acid micropattern on titanium surface, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* (2014). <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34867>.
- [16] Z. Li, C. Liu, B. Wang, C. Wang, Z. Wang, F. Yang, C. Gao, H. Liu, Y. Qin, J. Wang, Heat treatment effect on the mechanical properties, roughness and bone ingrowth capacity of 3D printing porous titanium alloy, *RSC Adv.* (2018). <https://doi.org/10.1039/c7ra13313h>.
- [17] J. Liu, S.C.F. Rawlinson, R.G. Hill, F. Fortune, Strontium-substituted bioactive glasses in vitro osteogenic and antibacterial effects, *Dent. Mater.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.12.013>.
- [18] X. Liu, P.K. Chu, C. Ding, Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. R Reports.* (2004). <https://doi.org/10.1016/j.mser.2004.11.001>.
- [19] Q.L. Ma, L.Z. Zhao, R.R. Liu, B.Q. Jin, W. Song, Y. Wang, Y.S. Zhang, L.H. Chen, Y.M. Zhang, Improved implant osseointegration of a nanostructured titanium surface via mediation of macrophage polarization, *Biomaterials.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.025>.
- [20] H. Minamikawa, T. Ikeda, W. Att, Y. Hagiwara, M. Hirota, M. Tabuchi, H. Aita, W. Park, T. Ogawa, Photofunctionalization increases the bioactivity and osteoconductivity of the titanium alloy Ti6Al4V, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* (2014). <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35030>.
- [21] P.V. Miranda, J.A. Rodrigues, A. Blay, J.A. Shibli, A. Cassoni, Surface alterations of zirconia and titanium substrates after Er,Cr:YSGG irradiation, *Lasers Med. Sci.* (2014). <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1516-x>.
- [22] D.P. Oliveira, A. Palmieri, F. Carinci, C. Bolfarini, Gene expression of human osteoblasts cells on chemically treated surfaces of Ti-6Al-4V-ELI, *Mater. Sci. Eng. C.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.011>.

- [23] M. Ravelingien, S. Mullens, J. Luyten, V. Meynen, E. Vinck, C. Vervaet, J.P. Remon, Thermal decomposition of bioactive sodium titanate surfaces, *Appl. Surf. Sci.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.07.091>.
- [24] N.D. Ravi, R. Balu, T.S. Sampath Kumar, Strontium-substituted calcium deficient hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, characterization, and antibacterial properties, in: *J. Am. Ceram. Soc.*, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2012.05262.x>.
- [25] G.E. Salvi, D.D. Bosshardt, N.P. Lang, I. Abrahamsson, T. Berglundh, J. Lindhe, S. Ivanovski, N. Donos, Temporal sequence of hard and soft tissue healing around titanium dental implants, *Periodontol.* 2000. (2015). <https://doi.org/10.1111/prd.12054>.
- [26] A. Sepahvandi, F. Moztafzadeh, M. Mozafari, M. Ghaffari, N. Raei, Photoluminescence in the characterization and early detection of biomimetic bone-like apatite formation on the surface of alkaline-treated titanium implant: State of the art, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.027>.
- [27] T.J. Sheu, E.M. Schwarz, D.A. Martinez, R.J. O'Keefe, R.N. Rosier, M.J. Zuscik, J.E. Puzas, A phage display technique identifies a novel regulator of cell differentiation, *J. Biol. Chem.* (2003). <https://doi.org/10.1074/jbc.M208292200>.
- [28] X. Shi, Q. Qian, L. Xu, H. Zhu, L. Xu, Q. Wang, Effects of hydrothermal sterilization on properties of biological coating fabricated by alkaline-heat treatment on titanium, *Surf. Coatings Technol.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.02.072>.
- [29] X. Shi, K. Tsuru, L. Xu, G. Kawachi, K. Ishikawa, Effects of solution pH on the structure and biocompatibility of Mg-containing TiO<sub>2</sub> layer fabricated on titanium by hydrothermal treatment, *Appl. Surf. Sci.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.01.046>.
- [30] J.A. Shibli, S. Grassi, L.C. De Figueiredo, M. Feres, E. Marcantonio, G. Iezzi, A. Piattelli, Influence of implant surface topography on early osseointegration: A histological study in human jaws, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* (2007). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30608>.
- [31] K. Suchanek, A. Bartkowiak, A. Gdowik, M. Perzanowski, S. Kaç, B. Szaraniec, M. Suchanek, M. Marszałek, Crystalline hydroxyapatite coatings synthesized under hydrothermal conditions on modified titanium substrates, *Mater. Sci. Eng. C.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.029>.
- [32] H. Terheyden, N.P. Lang, S. Bierbaum, B. Stadlinger, Osseointegration - communication of cells, *Clin. Oral Implants Res.* (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02327.x>.
- [33] P.M. Tsimbouri, L. Fisher, N. Holloway, T. Sjöstrom, A.H. Nobbs, R.M.D. Meek, B. Su, M.J. Dalby, Osteogenic and bactericidal surfaces from hydrothermal titania nanowires on titanium substrates, *Sci. Rep.* (2016). <https://doi.org/10.1038/srep36857>.
- [34] S. Wu, X. Liu, K.W.K. Yeung, H. Guo, P. Li, T. Hu, C.Y. Chung, P.K. Chu, Surface nano-architectures and their effects on the mechanical properties and corrosion behavior of Ti-based orthopedic implants, *Surf. Coatings Technol.* (2013).

- <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2012.10.023>.
- [35] L. Zhao, H. Wang, K. Huo, X. Zhang, W. Wang, Y. Zhang, Z. Wu, P.K. Chu, The osteogenic activity of strontium loaded titania nanotube arrays on titanium substrates, *Biomaterials*. (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.041>.
- [36] W. Zhang, Y. Shen, H. Pan, K. Lin, X. Liu, B.W. Darvell, W.W. Lu, J. Chang, L. Deng, D. Wang, W. Huang, Effects of strontium in modified biomaterials, *Acta Biomater.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.031>.
- [37] S. Panzavolta, P. Torricelli, L. Sturba, B. Bracci, R. Giardino, A. Bigi, Setting properties and in vitro bioactivity of strontium-enriched gelatin-calcium phosphate bone cements, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. (2008). <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31412>.
- [38] K. Anselme, Osteoblast adhesion on biomaterials, *Biomaterials*. (2000). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2).
- [39] R. Rajaraman, D.E. Rounds, S.P.S. Yen, A. Rembaum, A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro, *Exp. Cell Res.* (1974). [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(74\)90248-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(74)90248-1).



### 3.2 Publicação 2\*

#### **Avaliação de propriedades físicas e biológicas da liga Ti-6Al-4V-ELI, após diferentes texturizações superficiais**

Cominotte MA, DP Oliveira, Matos FG, Baroni LFS, Bolfarini C, Cirelli JA.

#### **RESUMO**

Atualmente, o desenvolvimento de novas ligas de titânio e modificações produzidas nas superfícies dos implantes visam favorecer o processo de osteogênese e, conseqüentemente, a osseointegração dos implantes dentários, em áreas de má qualidade óssea. O objetivo desse estudo foi caracterizar fisicamente e biologicamente superfícies texturizadas da liga de Ti - 6 Alumínio - 4 Vanádio-ELI (Ti-6Al-4V-ELI), com jateamento de partículas de Alumina ( $Al_2O_3$ ), tratadas com ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) e associadas ao tratamento com hidróxido de sódio (NaOH), bem como, a liga Ti-6Al-4V-ELI, com jateamento de partículas, tratadas com ácido fosfórico e clorídrico ( $H_3PO_4$  e HCl). Neste trabalho foram avaliadas a rugosidade superficial, área efetiva das amostras e o comportamento biológico de células de linhagem pré-osteoblástica (MC3T3-E1), por meio de ensaios de viabilidade, adesão, morfologia e diferenciação celular. Os grupos foram divididos de acordo com as texturizações superficiais da liga, sendo eles: Grupo A: Ticp (Sem Texturização); Grupo B: Ti-6Al-4V-ELI com jateamento + HCl e  $H_3PO_4$  e Grupo C: Ti-6Al-4V-ELI com jateamento +  $H_3PO_4$  e NaOH. Os resultados da caracterização física, obtidos por microscopia confocal a laser, demonstraram que, o Grupo B apresentou maior aumento da rugosidade e da área efetiva superficial, quando comparado aos Grupos A e C. As células MC3T3-E1 demonstraram-se viáveis, em todas as superfícies, com destaque para as superfícies texturizadas do Grupo B (Two Way Anova/Bonferroni  $p < 0,05$ ). O espriamento celular e a expressão gênica das proteínas relacionadas à osteogênese foram mais evidentes nos Grupos B e C quando comparados ao Grupo A. Diante dos resultados apresentados, concluímos que as células cultivadas sobre a superfície do Grupo B destacaram-se com relação à viabilidade e a maturação osteoblástica, contudo, os discos dos Grupo C, também demonstraram biocompatibilidade e permitiram a diferenciação celular quando comparados ao Grupo A. Deste modo, demonstramos que os tratamentos utilizados para as texturizações dos discos dos Grupos B e C, foram eficazes em alterar a topografia superficial da liga Ti-6Al-4V-ELI, destacando-se o benefício da indução de rugosidade superficial, com a produção de alterações superfícies de grandezas micrométricas e nanométricas, que atuam diretamente sobre os mecanismos de adesão celular, e maturação de células de linhagem osteoblástica, melhorando a osseointegração dos implantes dentários, instalados em regiões com deficiência óssea.

**Palavras-chave:** Titânio. Osseointegração. Osteoblastos.

---

\* Artigo formatado segundo as normas do periódico *Materials Science and Engineering C*, para o qual pretendemos submeter esta publicação.

## ABSTRACT

Currently, the development of new titanium alloys and modifications on their surfaces aim to favor the osteogenesis process and consequently the osseointegration of dental implants, in areas of poor bone quality. The objective of this study was to characterize physically and biologically textured surfaces of the Ti-6 Aluminum-4 Vanadium-ELI (Ti-6Al-4V-ELI) alloy, treated with sandblasting particles and phosphoric acid ( $H_3PO_4$ ) associated with the sodium hydroxide (NaOH), and, as well as the Ti-6Al-4V-ELI alloy treated with sandblasting  $Al_2O_3$  particles associated phosphoric and hydrochloric acid ( $H_3PO_4$  and HCl). In this study, surface roughness, effective sample area and biological behavior of cells of pre-osteoblastic lineage (MC3T3-E1) were evaluated using viability, adhesion, morphology and cell differentiation tests. The groups were divided according to the surface textures of the alloy: Group A: Ticip (No Texturing); Group B: Ti-6Al-4V-ELI + Blasting + HCl and  $H_3PO_4$  and Group C: Ti-6Al-4V-ELI + Blasting +  $H_3PO_4$  and NaOH. The results of physical characterization, obtained by confocal laser microscopy, showed that Group B presented greater increase in roughness and effective surface area when compared to Groups A and C. MC3T3-E1 cells proved to be viable in all the surfaces, with emphasis on the textured surfaces of Group B ( $p < 0.05$ , Two Way Anova/Bonferroni). Cell spreading and gene expression of proteins related to osteogenesis was more evident in Groups B and C, when, correlated to Group A. In view of the results, we conclude that the cells cultured on the surface of Group B stood out in relation to viability and osteoblastic maturation; however, the disks of Group C, also demonstrated biocompatibility and allowed cell differentiation when compared to Group A. According to the results, both treatments used for the textures of the disk surfaces were effective in altering the surface topography of the Ti-6Al-4V-ELI alloy, highlighting the benefit of inducing surfaces roughness, mainly by producing surfaces of micrometric and nanometric quantities, which act directly on the mechanisms of cell adhesion and maturation of cells of osteoblastic lineage suggesting improvement of the osseointegration of dental implants, installed in regions with bone deficiency.

**Keywords:** Titanium. Osseointegration. Osteoblasts.

## 1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários têm a finalidade de restaurar as funções que foram comprometidas devido às perdas dentais, causadas por injúrias locais, doenças adquiridas, congênitas ou problemas sistêmicos. Os implantes dentários são inseridos por meio de procedimentos cirúrgicos, nos ossos dos maxilares, e retidos pela íntima relação dos tecidos periimplantares, circundantes à área superficial dos mesmos [24]. Cuidados pré-operatórios e pós-operatórios pré-estabelecidos devem ser considerados, bem como a saúde do paciente, para o sucesso da osseointegração dos implantes [7]. Imediatamente após a instalação de um implante, ocorre uma sequência de eventos entre a interface osso e implante, que se inicia com uma interação entre o sangue e a superfície do implante, na qual, proteínas são dinamicamente adsorvidas, além de processos inflamatórios posteriores à colocação do mesmo, que precedem a formação óssea inicial ao redor do implante [14].

As propriedades físicas e químicas das superfícies dos implantes, bem como suas características topográficas determinarão o padrão das trocas iônicas entre os tecidos periimplantares e os implantes. Dentre essas, os parâmetros de rugosidade desempenham um papel fundamental na relação entre o tecido ósseo e os dispositivos implantados [16]. Portanto, é esperado que as modificações nas superfícies dos implantes promovam respostas celulares distintas, em diferentes superfícies [20].

As superfícies mais rugosas, apresentam a tendência de serem mais favoráveis à osteogênese celular, quando comparadas às superfícies com rugosidade menos proeminente, devido às interações que ocorrem entre os fluídos biológicos, células e tecidos adjacentes aos implantes dentários [20].

A adsorção, adesão e o espreadimento pertencem à primeira fase da interação célula/material. Isso engloba vários fenômenos até que a célula esteja adsorvida sobre o material. A qualidade desta fase influenciará na capacidade da célula de se proliferar e se diferenciar em contato com o implante.

Uma variedade de métodos são estudados, buscando-se o desenvolvimento de superfícies de titânio (Ti), bem como de suas ligas, com diferentes níveis de rugosidade e molhabilidade, para que ocorra o aumento da área de contato na interface entre implante e tecido ósseo, favorecendo a retenção de coágulo, para a estimulação da cicatrização [14].

Os métodos para alteração superficial do Ti mais utilizados são divididos basicamente em dois grupos: métodos de subtração (plasma-spray, ataques químicos

com substâncias ácidas e básicas, e anodização) e processos de adição (jateamento de partículas e revestimentos com partículas ou polímeros) [16].

De acordo com Albrektsson e Wennerberg [29, 30] as superfícies dos implantes dentários podem ser classificadas de acordo com as seguintes categorias: liso (Rugosidade aritmética ( $S_a$ ) < 0,5  $\mu\text{m}$ ); minimamente rugoso ( $S_a$  entre 0,5 – 1,0  $\mu\text{m}$ ); moderadamente rugoso ( $S_a$  entre 1,0 – 2,0  $\mu\text{m}$ ) e rugoso ( $S_a$  > 2,0  $\mu\text{m}$ ). Adicionalmente, estes autores, descrevem em seu trabalho, que os implantes com superfícies moderadamente rugosas ( $S_a$ : 1,0 – 2,0  $\mu\text{m}$ ) apresentam melhores respostas do tecido ósseo, comparadas às superfícies mais lisas ou com rugosidades maiores.

Recentemente, foi demonstrado por um estudo conduzido em modelo animal, que as amostras de Ti que passaram por processamentos de jateamento de partículas, seguido de duplo-ataque ácido, denominadas de superfícies SLA (Sandblasted, Large grit, Acid-etched) e classificadas como superfícies moderadamente rugosas, produziram maior área efetiva de contato entre as interfaces de osso-implante, em comparação com superfícies que receberam apenas o processamento com duplo-ataque ácido [1].

Além disto, atualmente as superfícies nanotexturizadas também são amplamente estudadas, pelo seu efeito na modulação das respostas celulares de osteoblastos, sobre as superfícies de implantes de titânio, alterando diretamente o processo de osseointegração. Adicionalmente foi demonstrado que o tratamento com ácidos  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_2$  produzem microporosidades nas superfícies, regulando regulam positivamente um conjunto de moduladores do fenótipo osteoblástico [19]

Entretanto, mesmo com o aumento dos estudos e das técnicas descritas na literatura, novas propostas de tratamentos superficiais surgem, buscando demonstrar e elucidar as interações que ocorrem entre as células e as superfícies dos implantes de Ti, procurando-se avaliar mais precisamente os mecanismos da osseointegração, por meio de análises da morfologia, adesão, migração, proliferação e diferenciação de células precursoras ósseas.

Deste modo, a proposta deste trabalho consiste na avaliação das características físicas e do comportamento biológico das amostras da liga Ti-6Al-4V-ELI após a modificação superficial com jateamento, associadas ao condicionamento químico com ácido fosfórico e hidróxido de sódio ( $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaOH}$ ), ou com ácido clorídrico e ácido fosfórico ( $\text{HCl} / \text{H}_3\text{PO}_4$ ).

## 2 MATERIAL E MÉTODO

O Ticp é o metal mais utilizado pela literatura como grupo controle dos estudos conduzidos com implantes ortopédicos e dentários. Assim, para testar os diferentes tratamentos realizados na superfície da liga Ti-6Al-4V-ELI, as amostras deste trabalho foram divididas em 3 grupos. Grupo A (controle): Discos de Ticp; Grupo B: Discos de Ti-6Al-4V-ELI com tratamento duplo-ácido (HCl + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) associado ao jateamento de partículas de alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>); Grupo C: Discos de Ti-6Al-4V-ELI com tratamento ácido-básico (HCl + NaOH) associado ao jateamento de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

### 2.1 Obtenção Das Amostras

As amostras dos Grupos A, B e C, foram cortadas pelo método a laser a partir de uma barra de Ticp (Grupo A) ou de Ti-6Al-4V-ELI - ASTM 136 (Grupos B e C), todas com 3 mm de espessura, e 10mm de diâmetro. Todas as amostras foram polidas com lixas, até chegarem às lixas com granulação de 1500. Após o polimento as amostras foram mergulhadas em água deionizada, para a limpeza dos detritos dos espécimes.

Posteriormente as amostras polidas foram divididas em 3 grupos, segundo os tratamentos que receberiam ou não, segundo a descrição do Quadro 1 abaixo:

**Quadro 1:** Descrição dos tipos de amostras, distribuídas de acordo com os diferentes tratamentos de modificação superficial.

Grupos	Material Base	Jateamento Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + NaOH Ácido-Básico	HCl + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> Duplo-Ácido	Texturização Superficial
A	Ticp	Não	Não	Não	Macro
B	Ti-6Al-4V-ELI	Sim	Não	Sim	Macro-Micro
C	Ti-6Al-4V-ELI	Sim	Sim	Não	Macro-Micro-Nano

### 2.2 Métodos De Modificação Superficial

#### 2.2.1 Jateamento

Previamente à realização dos tratamentos químicos deste Estudo, as amostras dos grupos B e C foram jateadas com partículas de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, de acordo com os

protocolos e parâmetros da empresa responsável por este procedimento (*Cascadura, Brasil*).

### **2.2.2 Tratamento duplo-ácido**

Os discos do Grupo B foram tratados com solução de HCl, por um período de 30 minutos, e logo em seguida, imersas em solução de  $H_3PO_4$ , e mantidos também por um período de 30 minutos.

### **2.2.3 Tratamento ácido-básico**

Os discos do Grupo B foram tratados com solução de  $H_3PO_4$  durante 30 minutos. Posteriormente os discos foram imersos em solução básica de NaOH, durante um período de 24 horas.

## **2.3 Esterilização**

Previamente aos testes celulares, todas as amostras foram esterilizadas por meio da radiação gama (*EMBRARAD, Brasil*).

## **2.4 Caracterização Física**

### **2.4.1 Avaliação da rugosidade superficial e da área efetiva**

Os parâmetros da análise da rugosidade superficial, e as medidas de área efetiva das amostras foram analisadas por meio de um microscópio confocal a laser (*OLYMPUS – LEXT OLS 4000*). Foram obtidas imagens em magnificação de 30x, com as reconstruções das superfícies estudadas em formato 3D. Após a obtenção das imagens, as características das amostras foram expressas em formato de gráficos, com as medidas tabeladas pelo próprio programa equipamento. Para este ensaio foram avaliadas 3 amostras por grupo.

## **2.5 Caracterização biológica**

Para avaliar a biocompatibilidade das amostras, foram realizados ensaios *in vitro* com a linhagem celular pré-osteoblástica do tipo MC3T3-E1 (*BCRJ, Brasil*), proveniente da calvária de camundongos.

### **2.5.1 Cultivo e plaqueamento celular**

As células foram cultivadas em meio de cultura celular do tipo  $\alpha$ -MEM, suplementado com 10% de FBS, 100 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, em placas de 100 mm específicas para a cultura de células, mantidas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Após atingirem a confluência em torno de 80%, as mesmas eram repicadas e posteriormente plaqueadas entre a segunda e terceira passagem (P2 e P3), em uma concentração de  $2 \times 10^4$  sobre os discos de titânio.

Os discos com as células semeadas na camada superficial foram acondicionadas individualmente, em placa de cultura celular de 24 poços, e mantidos em meio  $\alpha$ -MEM com 10% de FBS, 100 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, suplementado com 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 10 mmol.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -glicerofosfato, para estímulo da diferenciação osteoblástica. Após o período de adesão celular, 24 horas, os discos foram transferidos para uma placa com um novo poço de cultura.

### **2.5.2 Análise da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada durante os períodos de 1, 3, 7, 10, 14 e 21 dias de incubação por meio do reagente Alamar Blue (*Molecular Probes, EUA*). Os discos de titânio foram incubados individualmente em uma placa de 24 poços, contendo a solução de trabalho do Alamar Blue ( $\alpha$ -MEM associado ao reagente Alamar Blue). Foram utilizadas como controle negativo a própria solução de trabalho do alamar Blue. Após o tempo de incubação de 4 h, alíquotas de 150  $\mu$ L foram coletadas de cada amostra, transferidas para uma placa de 96 poços e realizada a leitura em um espectrofotômetro em comprimentos de onda de 570 e 600 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata, com três repetições em momentos distintos.

### **2.5.3 Análise do espriamento e da morfologia celular**

O espriamento e a morfologia celular foram avaliadas no terceiro dia de cultivo das células, em contato direto com as superfícies de TiCP e Ti-6Al-4V-ELI, por meio de MEV e fluorescência direta, respectivamente.

Para avaliação do espriamento celular por meio das imagens obtidas pelo ensaio de MEV, as células aderidas aos discos de titânio foram fixadas com soluções de glutaraldeído (*Sigma, EUA*) em  $\alpha$ MEM puro (*Gibco, EUA*), e glutaraldeído (*Sigma, EUA*) em tampão cacodilato (*Sigma, EUA*), lavadas em PBS (*phosphate buffered saline*) e desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico. Após secagem em dissecador a vácuo as amostras receberam deposição de uma camada ouro para análise em MEV. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três momentos distintos. Três micrografias de cada amostra foram utilizadas para a análise.

Para análise das imagens por fluorescência direta as células foram coradas com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (*Molecular Probes, Eugene, OR, EUA*) associadas ao corante à base de dihidroclorato de 4', 6-diamidino-2-fenilindole (*DAPI, Molecular Probes*). Para a análise foram realizadas 3 imagens de cada amostra, por meio de microscópio eletrônico confocal a laser (*AMG, Evos fl<sup>®</sup>*). Os experimentos foram realizados em triplicata, com 3 repetições em ocasiões distintas, sendo que 3 micrografias foram realizadas de cada amostra.

#### **2.5.4 Expressão Gênica**

Para avaliação da expressão de genes de proteínas relacionadas à osteogênese, foram avaliados por meio de PCR-Array (*Qiagen, EUA*), 84 genes relacionados à diferenciação osteogênica (Fig. 1), nos períodos de 7 e 14 dias. A extração e purificação do RNA total das células cultivadas sobre as amostras, foram realizadas pelo kit Rneasy MiniKit (*Qiagen, EUA*) segundo as instruções do fabricante. A primeira cadeia de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada utilizando-se o kit de Primeira Cadeia RT2 (*Qiagen, EUA*). Para o PCR-Array foi utilizado o Master Mix SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Mastermix (*Qiagen, EUA*), contendo as porções dos genes específicos anteriormente escolhidos. O experimento foi realizado com as amostras em triplicata, em um único momento.

Para análise dos dados obtidos, os valores foram exportados online para o site da empresa (<http://www.qiagen.com/geneglobe>), e a normalização dos dados realizados segundo os parâmetros da mesma. Os resultados são gerados em fold-



change utilizando-se o método do delta Ct, calculado e relacionado aos genes de interesse, com as médias dos genes de referência.

Position	RefSeq Number	Symbol	Description
A01	NM_007394	Acvr1	Activin A receptor, type 1
A02	NM_013465	Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein
A03	NM_007431	Alpl	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
A04	NM_009673	Anxa5	Annexin A5
A05	NM_007541	Bglap	Bone gamma carboxyglutamate protein
A06	NM_007542	Bgn	Biglycan
A07	NM_009755	Bmp1	Bone morphogenetic protein 1
A08	NM_007553	Bmp2	Bone morphogenetic protein 2
A09	NM_173404	Bmp3	Bone morphogenetic protein 3
A10	NM_007554	Bmp4	Bone morphogenetic protein 4
A11	NM_007555	Bmp5	Bone morphogenetic protein 5
A12	NM_007556	Bmp6	Bone morphogenetic protein 6
B01	NM_007557	Bmp7	Bone morphogenetic protein 7
B02	NM_009758	Bmpr1a	Bone morphogenetic protein receptor, type 1A
B03	NM_007560	Bmpr1b	Bone morphogenetic protein receptor, type 1B
B04	NM_007561	Bmpr2	Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
B05	NM_007643	Cd36	CD36 antigen
B06	NM_009866	Cdh11	Cadherin 11
B07	NM_009893	Chrd	Chordin
B08	NM_009925	Col10a1	Collagen, type X, alpha 1
B09	NM_181277	Col14a1	Collagen, type XIV, alpha 1
B10	NM_007742	Col1a1	Collagen, type I, alpha 1
B11	NM_007743	Col1a2	Collagen, type I, alpha 2
B12	NM_031163	Col2a1	Collagen, type II, alpha 1
C01	NM_009930	Col3a1	Collagen, type III, alpha 1
C02	NM_009931	Col4a1	Collagen, type IV, alpha 1
C03	NM_015734	Col5a1	Collagen, type V, alpha 1
C04	NM_016685	Comp	Cartilage oligomeric matrix protein
C05	NM_007778	Csf1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
C06	NM_009969	Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
C07	NM_009971	Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
C08	NM_007802	Ctsk	Cathepsin K
C09	NM_198854	Dlx5	Distal-less homeobox 5
C10	NM_010113	Egf	Epidermal growth factor
C11	NM_010197	Fgf1	Fibroblast growth factor 1
C12	NM_008006	Fgf2	Fibroblast growth factor 2
D01	NM_010206	Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1
D02	NM_010207	Fgfr2	Fibroblast growth factor receptor 2
D03	NM_010228	Fit1	FMS-like tyrosine kinase 1
D04	NM_010233	Fn1	Fibronectin 1
D05	NM_145741	Gdf10	Growth differentiation factor 10
D06	NM_010296	Gli1	GLI-Kruppel family member GLI1
D07	NM_010493	Icam1	Intercellular adhesion molecule 1
D08	NM_010512	Igf1	Insulin-like growth factor 1
D09	NM_010513	Igf1r	Insulin-like growth factor I receptor
D10	NM_010544	lhh	Indian hedgehog

Position	RefSeq Number	Symbol	Description
D11	NM_008396	Itga2	Integrin alpha 2
D12	NM_010575	Itga2b	Integrin alpha 2b
E01	NM_013565	Itga3	Integrin alpha 3
E02	NM_008401	Itgam	Integrin alpha M
E03	NM_008402	Itgav	Integrin alpha V
E04	NM_010578	Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
E05	NM_019471	Mmp10	Matrix metalloproteinase 10
E06	NM_008610	Mmp2	Matrix metalloproteinase 2
E07	NM_008611	Mmp8	Matrix metalloproteinase 8
E08	NM_013599	Mmp9	Matrix metalloproteinase 9
E09	NM_008689	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105
E10	NM_008711	Nog	Noggin
E11	NM_008808	Pdgfra	Platelet derived growth factor, alpha
E12	NM_011077	Phex	Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome (hypophosphatemia, vitamin D resistant rickets)
F01	NM_009820	Runx2	Runt related transcription factor 2
F02	NM_009825	Serpinh1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1
F03	NM_008539	Smad1	MAD homolog 1 (Drosophila)
F04	NM_010754	Smad2	MAD homolog 2 (Drosophila)
F05	NM_016769	Smad3	MAD homolog 3 (Drosophila)
F06	NM_008540	Smad4	MAD homolog 4 (Drosophila)
F07	NM_008541	Smad5	MAD homolog 5 (Drosophila)
F08	NM_024449	Sost	Sclerostin
F09	NM_011448	Sox9	SRY-box containing gene 9
F10	NM_130458	Sp7	Sp7 transcription factor 7
F11	NM_009263	Spp1	Secreted phosphoprotein 1
F12	NM_011577	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1
G01	NM_009367	Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2
G02	NM_009368	Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3
G03	NM_009370	Tgfb1	Transforming growth factor, beta receptor I
G04	NM_009371	Tgfb2	Transforming growth factor, beta receptor II
G05	NM_011578	Tgfb3	Transforming growth factor, beta receptor III
G06	NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor
G07	NM_011613	Tnfrsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
G08	NM_011658	Twist1	Twist homolog 1 (Drosophila)
G09	NM_011693	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1
G10	NM_009504	Vdr	Vitamin D receptor
G11	NM_009505	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A
G12	NM_011697	Vegfb	Vascular endothelial growth factor B
H01	NM_007393	Actb	Actin, beta
H02	NM_009735	B2m	Beta-2 microglobulin
H03	NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta
H05	NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1
H06	SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination
H07	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

**Figura 1:** Genes expressos relacionados à via osteogênica

Fonte: RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Sheet (Qiagen, EUA)

## 2.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism v.5 (La Jolla, EUA), utilizando-se o método de Two - Anova complementado pelo pós-teste de Bonferoni, adotando-se o nível de significância de 5%.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Caracterização Física

Abaixo são detalhados e descritos todos os dados obtidos pela avaliação da caracterização superficial das amostras de Ti-6Al-4V-ELI.

##### 3.1.1 Análise da rugosidade superficial

A partir da análise dos resultados, observamos que as amostras do Grupo B apresentaram maiores valores, tanto em rugosidade de área superficial ( $S_a$ ), quanto na presença de picos mais altos ( $S_z$ ) (Tabela 1), quando comparadas às amostras dos outros Grupos A e C. Deste modo, podemos dizer que estas amostras do Grupo B apresentam-se mais rugosas que as amostras dos Grupos A e C.

**Tabela 1:** Rugosidade superficial das amostras investigadas, medidas em uma área de  $16.768 \mu\text{m}^2$  ( $S_a$ : rugosidade em área;  $S_z$ : altura máxima)

Grupos	$S_a$ [ $\mu\text{m}$ ] ( $\pm$ desv. Pad.)	$S_z$ [ $\mu\text{m}$ ] ( $\pm$ desv. Pad.)
A) S/ Text	0,016 (0,002)	0,293 (0,045)
B) Text Macro-Micro	0,246 (0,108)	4,418 (1,700)
C) Tex Macro-Micro-Nano	0,182 (0,042)	2,898 (0,920)

##### 3.1.2 Área Efetiva Superficial

A análise da área efetiva superficial das amostras dos Grupos A-C (Tabela 2), confirmou os resultados obtidos pela análise da rugosidade, demonstrando que o Grupo B se apresenta mais rugoso, e conseqüentemente com maior área efetiva superficial, quando comparado aos Grupos A e C.

**Tabela 2:** Área Efetiva Superficial das amostras investigadas.

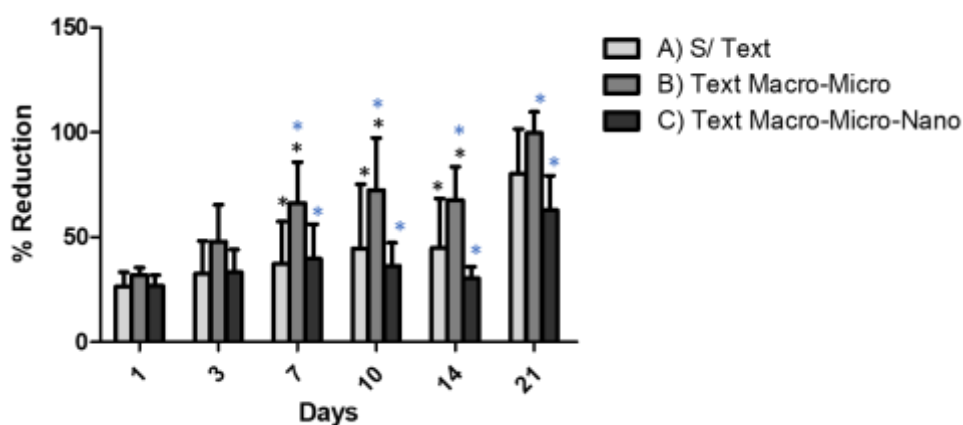
Grupos	Área Efetiva ( $\pm$ desv. Pad.)	% de aumento
A) S/ Text	1,044 (0,002)	4,4
B) Tex Macro-Micro	2,480 (0,931)	248,0
C) Tex Macro-Micro-Nano	1,882 (0,042)	188,2

### 3.2 Caracterização Biológica

Abaixo são detalhados e descritos todos os dados obtidos pela avaliação da caracterização da superfície das amostras de Ti-6Al-4V-ELI.

#### 3.2.1 Análise Da Viabilidade Celular

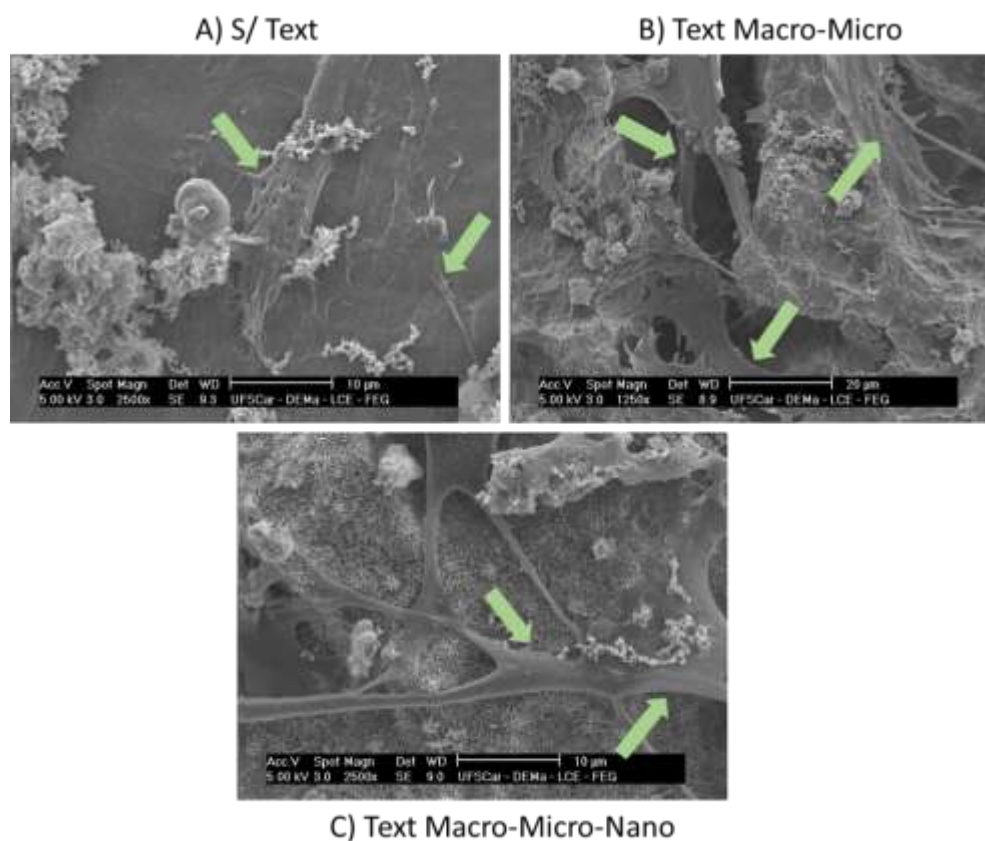
A viabilidade celular foi analisada nos períodos de 1, 3, 7, 10, 14 e 21 dias, com a finalidade de avaliação da biocompatibilidade das superfícies das amostras. Foi demonstrado que os Grupos A-C permitiram a adesão e a viabilidade celular ao longo de todos os períodos avaliados. A análise estatística apontou diferenças estatísticas significantes a partir do 7º dia de experimento. No período de 7, 10, 14 e 21 dias houve maior viabilidade celular para o Grupo B, comparado aos Grupo A e C (Fig. 2).



**Figura 2:** Viabilidade das células cultivadas sobre as amostras A, B e C, nos períodos de 1, 3, 7, 10, 14 e 21 dias. \*  $p < 0,05$  (Two Way Anova/Bonferroni). As cores preto e azul, representam a diferença estatística significante, entre as amostras com a mesma cor, no mesmo período.

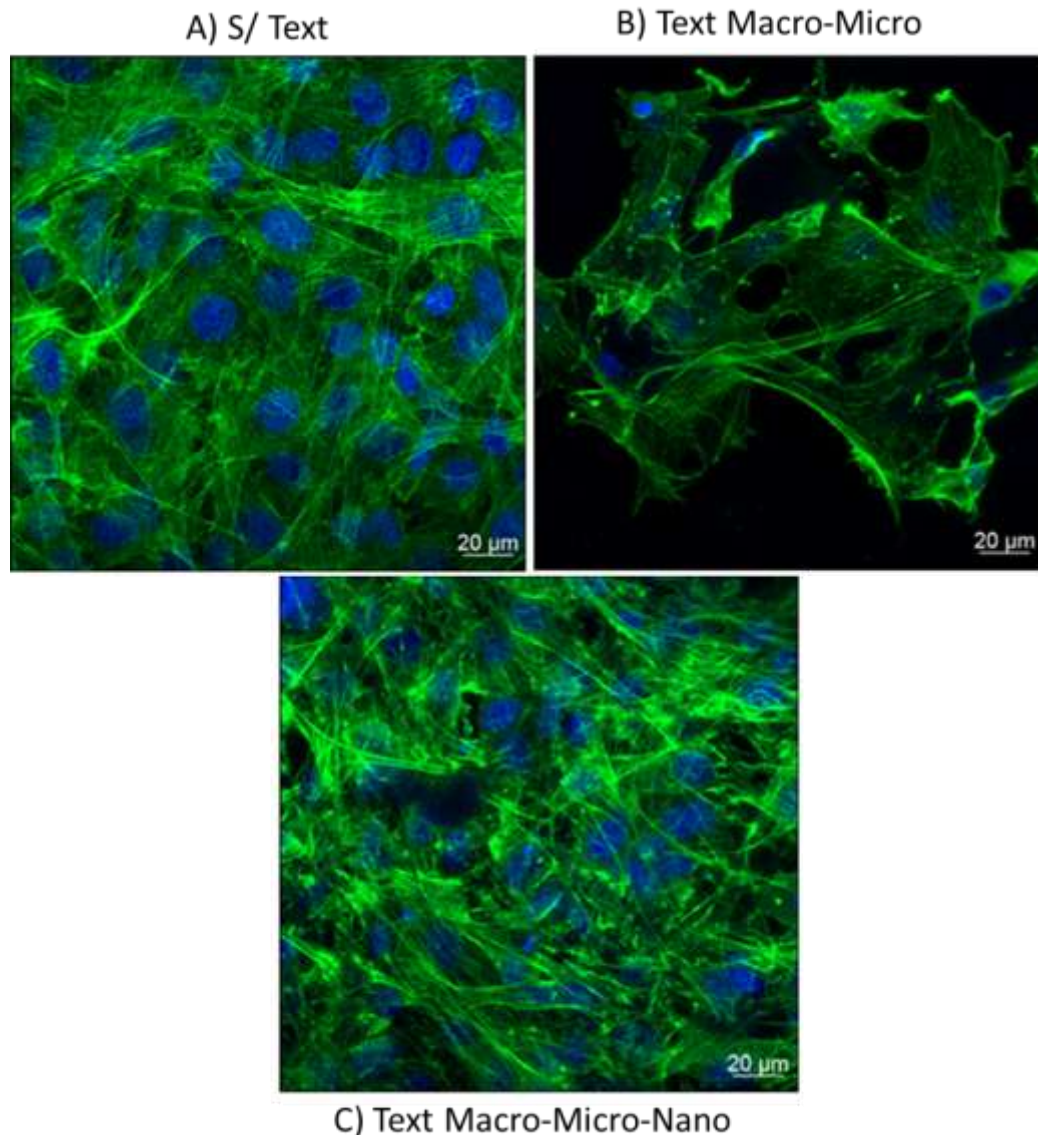
#### 3.2.2 Análise do espriamento e da morfologia celular

Avaliando-se as imagens da MEV (Fig. 3), foi possível observar que ocorreu adesão celular em todos os Grupos. Adicionalmente, além da adesão celular, também notamos a diferença na morfologia das células, em contato direto com os diferentes tipos de texturas superficiais das amostras. Este fenômeno indica a predileção pelas células MC3T3-E1, pelas superfícies mais rugosas (Grupos B e C) que superfícies lisas (Grupo A).



**Figura 3:** Imagens da MEV demonstrando a adesão celular sobre os discos dos Grupos A, B e C, em resoluções, de 2.500x, 1.500x e 2.500X, respectivamente, realizadas no terceiro dia de cultivo celular. As setas indicam as células sobre as superfícies.

O ensaio realizado pela coloração com análise em fluorescência direta (Fig.4), nos permitiu a observação da afinidade celular pelas superfícies dos Grupos B e C, comparados ao Grupo A. As células em contato com os discos do Grupo B, apresentam formatos mais alongados e estrelados, com características tridimensionais mais evidentes que as células dos Grupos A e C. Os resultados indicando a predileção das células pelas amostras do Grupo B, em relação aos outros Grupos.

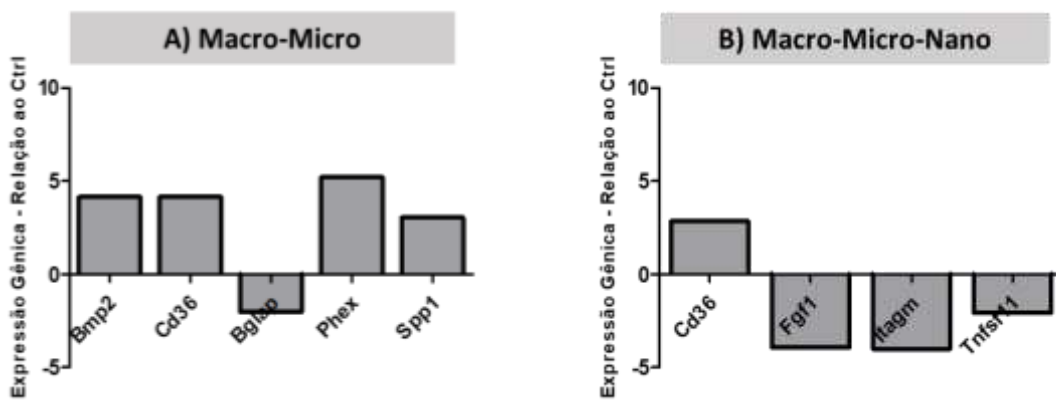


**Figura 4:** Imagens da fluorescência direta das células cultivadas sobre os discos dos Grupos A, B e C, no terceiro dia de cultivo celular. Núcleos celulares (Azul - DAPI), citoesqueleto (Verde - Phalloidin 488). Magnificação de 63x.

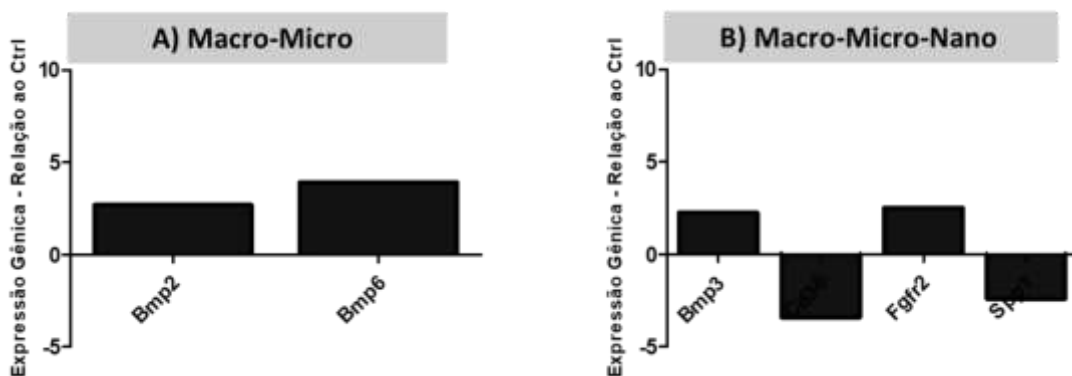
### 3.2.4 Análise Da Expressão Gênica

Para avaliação do fenótipo osteoblástico das células MC3T3-E1, analisamos vários genes que codificam proteínas e fatores de transcrição, associados às diferentes etapas de maturação dos pré-osteoblastos em osteoblastos. Os resultados foram analisados online, pela empresa da qual adquirimos todo o kit para a confecção do PCR- Array (*Qiagen, EUA*). Foram selecionados os principais genes relacionados à via osteogênica, que apresentaram maior expressão em comparação à amostra controle (Grupo A). Todas as amostras sinalizaram genes relacionados à via osteogênica. No período de 7 dias, as células do Grupo C expressaram genes

importantes relacionados à adesão celular, à formação e à mineralização da matriz óssea, a exemplo: *Cd36*, *Phex* e *Bmp7*, respectivamente. Porém as amostras do Grupo B expressaram o gene *Spp1*, característico de estágios de diferenciação celular mais tardios (Fig. 4 e 5). A mesma tendência do grupo B verificada em 7 dias foi confirmada no período de 14 dias do experimento, no qual, observamos a expressão de genes importantes como *Bmp2* e *Bmp6*, relacionadas aos processos de homeostasia óssea.



**Figura 4:** Gráficos em fold change da expressão gênica dos genes relacionados à via osteogênica, que apresentaram expressão maior que a amostra controle do Grupo A, quando comparadas aos Grupos B (Gráfico A) e C (Gráfico B), avaliadas no período de 7 dias.



**Figura 5:** Gráficos em fold change da expressão gênica dos genes relacionados à via osteogênica, que apresentaram expressão maior que a amostra controle do Grupo A, quando comparadas aos Grupos B (Gráfico A) e C (Gráfico B), avaliadas no período de 14 dias.

#### 4 DISCUSSÃO

A modificação superficial da liga Ti-6Al-4V-ELI, demonstrou que os tratamentos com jateamento associado aos condicionamentos duplo-ácido e ácido-básico, aplicados nos discos dos Grupos B e C, respectivamente, foram eficazes na texturização das superfícies.

Este fenômeno pode ser observado e confirmado por meios dos dados obtidos pelo Grupo B, seguido pelo Grupo C, em análise por microscopia confocal a laser, demonstrando maiores rugosidades e aumento da área efetiva, quando comparados ao Grupo A [7, 20, 24]. A rugosidade superficial dos implantes dentários é de fundamental relevância, para que ocorra a interação entre suas interfaces com as células precursoras ósseas [29].

Verificamos que o padrão de rugosidade da superfície das amostras de ambos os Grupos B e C, atuaram diretamente na viabilidade, adesão e diferenciação celular, quando comparadas ao Grupo A (controle), o que deve favorecer a formação da matriz óssea mineralizada, logo em períodos iniciais e, conseqüentemente, a osseointegração [28].

Adicionalmente, observamos nos ensaios de MEV (Fig. 2A-C), que as células de todos os Grupos, foram capazes de aderir às superfícies, emitindo prolongamentos citoplasmáticos, denominados de filopódias. A emissão destas filopódias são de extrema importância para definirmos a afinidade das células pelos materiais, os quais mantêm contato direto [2].

Nas imagens geradas pela avaliação da fluorescência direta (Fig. 3A-C), observamos, que as células dos Grupos B e C, encontram-se menos alongadas, comparadas às células do Grupo A. A partir do momento em que modificamos a rugosidade superficial das amostras, conseqüentemente ocorrem alterações na área efetiva superficial, que também influencia diretamente à adesão celular [13].

Entretanto, dependendo do condicionamento prévio das superfícies com substâncias ácidas ou básicas, a mesma superfície pode apresentar associação de diferentes tipos de rugosidades, sendo elas: macro e/ou micro e/ou nanotexturizadas. Deste modo, na mesma superfície podemos ter diferentes características topográficas da rugosidade [2].

A modificação superficial com jateamento de partículas, associada ao condicionamento com HCl e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, é denominada de SLA (Sand blasted Large-grit and Acid etched) e promove microrugosidades superficiais. Este tratamento é amplamente reportado pela literatura, e apresenta resultados favoráveis à



osseointegração, assim como observado neste estudo, pelo aumento da viabilidade e espraiamento celular das células do Grupo B.

As superfícies com o tratamento SLA, demonstram picos mais altos em algumas regiões, e em outras, concavidades e bordas mais atenuadas. Esta característica superficial influencia positivamente na adesão de células de linhagem osteoblástica, bem como, na mineralização e maturação da matriz óssea [15].

O condicionamento superficial com substâncias básicas (NaOH), favorecem à precipitação de uma camada de óxidos, que auxiliam na resistência à corrosão dos metais. Além disto, a associação de diferentes tipos de rugosidades (macro, micro e nanoestruturais), na mesma superfície, demonstram o favorecimento da osteogênese, principalmente com escalas nanométricas [9].

Delligianne et al. [3], demonstraram o efeito de diferentes rugosidades no comportamento de células ósseas cultivadas sobre superfícies de Ti-6Al-4V-ELI. As células foram cultivadas em superfícies com porosidades de 0,320  $\mu\text{m}$ ; 0,490  $\mu\text{m}$  e 0,874  $\mu\text{m}$  diâmetro. Os resultados obtidos, indicaram que o aumento da rugosidade favoreceu a adesão, proliferação e produção de fosfatase alcalina *Alpl*, pelas células humanas derivadas de medula óssea.

Em estudos prévios conduzidos pela nossa equipe, com a liga Ti-6Al-4V-ELI, tratada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e NaOH, demonstramos o favorecimento da expressão gênica de *SPP1* [10], em períodos iniciais de 7 dias. Este gene atua positivamente nos processos de osteogênese, antecipando os mecanismos de formação e mineralização da matriz óssea [5]. Outro estudo, também realizado pela nossa equipe, com o cultivo de osteoblastos em TiCP tratados com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e HCl, e, demonstra o favorecimento na expressão gênica de *Alpl*, *Col1a1*, *Col1a3*, *Spp1* e *Runx-2*, nos períodos 7 dias e 15 dias, com destaque para o gene *Spp1*, super-expresso pelos osteoblastos em contato com as amostras que receberam o tratamentos ácido-básico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  e NaOH) [4].

Alguns trabalhos com superfícies nanométricas, apontam aumentos na proliferação celular, produção de fosfatase alcalina (*ALP*) e maior deposição mineral pelas células precursoras ósseas [11, 12], comparados às superfícies Ti polidas. Estes achados corroboram com os resultados encontrados para o Grupo C deste Estudo em que observamos, no período inicial de 7 dias a expressão do gene *Cd36*, responsável pela diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos [10].

A partir da análise dos Gráficos das figuras 4A e 4B (7 dias); 5A e B (14 dias), observamos a expressão de genes relacionados à via osteogênica. Ambos os Grupos

(B e C) expressaram genes relacionados à diferenciação das células MC3T3-E1 em osteoblastos. A expressão de *Cd36* e a inibição de *Fgf1*, *Itgmn* e *Tnfrsf11*, no período de 7 dias, no Grupo C, demonstram a ativação da via osteogênica Wnt- $\beta$ -catenina, responsável pela maturação de pré-osteoblastos em osteoblastos, assim como a expressão de *Bmp2*, *Phex* e *Spp1*, pelo Grupo B, no mesmo período. No período de 14 dias identificamos a expressão de BMP's em ambos os grupos, indicando estimulação e a atividade de osteoblastos [17, 26].

Deste modo, observamos que os discos de Ti-6Al-4V-ELI, tratados pelos métodos físicos e químicos propostos neste trabalho, alteraram a topografia superficial das amostras. As novas superfícies obtidas, representadas pelos grupos B e C demonstraram efeito positivo com relação à biocompatibilidade e diferenciação celular. Entretanto, mais estudos são necessários para a elucidação completa do papel fundamental da influência da osteogênese das macro, micro e nanotexturizações.

## 5 CONCLUSÃO

Este Estudo demonstra que os tratamentos com jateamento de partículas de TiO<sub>2</sub> associados aos tratamentos ácido-básico e duplo ácido, utilizados para a modificação da rugosidade superficial da liga Ti-6Al-4V-ELI, foram eficazes e permitiram a adesão, viabilidade, e diferenciação das células MC3T3-E1, enfatizando os aspectos positivos do desenvolvimento de novas superfícies texturizadas, para o favorecimento dos processos de osseointegração de implantes dentários, inseridos em áreas com deficiência ou má qualidade óssea.

## REFERÊNCIAS

- [1] Buser, N. Brogini, M. Wieland, R.K. Schenk, A.J. Denzer, D.L. Cochran, B. Hoffmann, A. Lussi, S.G. Steinemann, Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface, *J. Dent. Res.* (2004). <https://doi.org/10.1177/154405910408300704>.
- [2] Chehroudi, T.R.L. Gould, D.M. Brunette, Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective-tissue cells differently in vivo, *J. Biomed. Mater. Res.* (1990). <https://doi.org/10.1002/jbm.820240906>.
- [3] D.D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, Y.F. Missirlis, Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption, *Biomaterials.* (2001).

[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00274-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00274-X).

[4] D.P. Oliveira, A. Palmieri, F. Carinci, C. Bolfarini, Gene expression of human osteoblasts cells on chemically treated surfaces of Ti-6Al-4V-ELI, *Mater. Sci. Eng. C.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.011>.

[5] D.P. Oliveira, A. Palmieri, F. Carinci, C. Bolfarini, Osteoblasts behavior on chemically treated commercially pure titanium surfaces, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* (2014). <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34855>.

[6] F. Di Palma, A. Guignandon, A. Chamson, M.H. Lafage-Proust, N. Laroche, S. Peyroche, L. Vico, A. Rattner, Modulation of the responses of human osteoblast-like cells to physiologic mechanical strains by biomaterial surfaces, *Biomaterials.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.041>.

[7] G. Mendonça, D.B.S. Mendonça, F.J.L. Aragão, L.F. Cooper, Advancing dental implant surface technology - From micron- to nanotopography, *Biomaterials.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.012>.

[8] G. Zhao, Z. Schwartz, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, D.L. Cochran, B.D. Boyan, High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* (2005). <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30320>.

[9] G.K. Thakral, R. Thakral, N. Sharma, J. Seth, P. Vashisht, Nanosurface-the future of implants, *J. Clin. Diagnostic Res.* (2014). <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8764.4355>.

[10] G.R. Beck, B. Zerler, E. Moran, Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2000). <https://doi.org/10.1073/pnas.140021997>.

[11] H. Jiang, X. Ma, W. Zhou, K. Dong, X. Rausch-Fan, S. Liu, S. Li, The Effects of Hierarchical Micro/Nano-Structured Titanium Surface on Osteoblast Proliferation and Differentiation Under Diabetic Conditions, *Implant Dent.* 26 (2017). <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000576>.

[12] J. Sela, U.M. Gross, D. Kohavi, J. Shani, D.D. Dean, B.D. Boyan, Z. Schwartz, Primary mineralization at the surfaces of implants, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* (2000). <https://doi.org/10.1177/10454411000110040301>.

[13] J. Zhang, J. Liu, C. Wang, F. Chen, X. Wang, K. Lin, A comparative study of the osteogenic performance between the hierarchical micro/submicro-textured 3D-printed Ti6Al4V surface and the SLA surface, *Bioact. Mater.* 5 (2020) 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.12.008>.

[14] J.E. Lemons, Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants, *J. Oral Implantol.* (2004). <https://doi.org/10.1563/0712.1>.

[15] K. Matsuzaka, X.F. Walboomers, J.E. De Ruijter, J.A. Jansen, The effect of poly-L-lactic acid with parallel surface micro on groove on osteoblast-like cells in vitro, *Biomaterials.* (1999). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00029-0).

[16] L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, Y. Amouriq, Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration, *Dent. Mater.* (2007). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.06.025>.

- [17] M. Tamura, E. Nemoto, Role of the Wnt signaling molecules in the tooth, *Jpn. Dent. Sci. Rev.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2016.04.001>.
- [18] O. Zinger, G. Zhao, Z. Schwartz, J. Simpson, M. Wieland, D. Landolt, B. Boyan, Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features, *Biomaterials.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.035>.
- [19] P. Tambasco De Oliveira, A. Nanci, Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells, *Biomaterials.* (2004). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00539-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00539-8).
- [20] P.G. Coelho, J.M. zao, G.E. Romanos, M. Suzuki, N.R.F. Silva, G. Cardaropoli, P. Van Thompson, J.E. Lemons, Basic research methods and current trends of dental implant surfaces, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* (2009). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31264>.
- [21] P.I. Brånemark, B.O. Hansson, R. Adell, U. Breine, J. Lindström, O. Hallén, A. Ohman, Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period., *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.* (1977).
- [22] R. Jimbo, M. Ivarsson, A. Koskela, Y.-T. Sul, C.B. Johansson, Protein Adsorption to Surface Chemistry and Crystal Structure Modification of Titanium Surfaces, *J. Oral Maxillofac. Res.* (2010). <https://doi.org/10.5037/jomr.2010.1303>.
- [23] R. Rajaraman, D.E. Rounds, S.P.S. Yen, A. Rembaum, A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro, *Exp. Cell Res.* (1974). [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(74\)90248-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(74)90248-1).
- [24] Schroeder, O. Pohler, F. Sutter, Gewebsreaktion auf ein Titan-Hohlzylinderimplantat mit Titan-Spritzschichtoberfläche, *SSO. Schweizerische Monatsschrift Fur Zahnheilkunde. Rev. Mens. Suisse d"odonto-Stomatologia. Riv. Mens. Svizz. Di Odontol. e Stomatol.* (1976).
- [25] T. Albrektsson, P.I. Brånemark, H.A. Hansson, J. Lindström, Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man, *Acta Orthop.* (1981). <https://doi.org/10.3109/17453678108991776>.
- [26] T. Gaur, C.J. Lengner, H. Hovhannisyanyan, R.A. Bhat, P.V.N. Bodine, B.S. Komm, A. Javed, A.J. Van Wijnen, J.L. Stein, G.S. Stein, J.B. Lian, Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression, *J. Biol. Chem.* (2005). <https://doi.org/10.1074/jbc.M500608200>.
- [27] T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics, *J. Biomed. Mater. Res.* (2000). [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20000905\)51:3<475:AID-JBM23>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20000905)51:3<475:AID-JBM23>3.0.CO;2-9).
- [28] Tomsia, M. Launey, J. Lee, M. Mankani, E. Saiz, Nanotechnology Approaches for Better Dental Implants, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* (2011).
- [29] Wennerberg, T. Albrektsson, B. Andersson, J.J. Krol, A histomorphometric study of screw-shaped and removal torque titanium implants with three different surface topographies, *Clin. Oral Implants Res.* (1995).

<https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1995.060103.x>.

[30] Wennerberg, T. Albrektsson, Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review, *Clin. Oral Implants Res.* (2009).  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x>.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de diferentes superfícies é um ponto crítico a ser discutido, de modo que, as propriedades físicas e químicas superficiais de um implante influenciam diretamente as interações entre proteínas e células osteogênicas, podendo determinar a qualidade da união entre a interface implante-osso.

Diversos métodos estão sendo desenvolvidos ou aprimorados para melhorar a qualidade óssea ao redor dos implantes dentários, bem como, diminuir o tempo de osseointegração, aumentando-se a taxa de sucesso nas reabilitações orais. As modificações superficiais, por meio da utilização de substâncias ácidas/básicas, deposição de partículas bioativas, ou jateamento de partículas, apresentam uma vasta literatura, com relação à biologia óssea, demonstrando resultados promissores em relação ao favorecimento da osseointegração de dispositivos implantáveis.

Este estudo propôs a caracterização física, química, biológica e microbiológica das superfícies de titânio comercialmente puro, bem como, a caracterização física e biológica da liga Ti-6Al-4V-ELI, ambas modificadas por meio de tratamentos superficiais, investigando-se as respostas celulares frente às diferentes texturizações promovidas nas superfícies. Diante das análises dos resultados, podemos dizer que, os tratamentos de superfície realizados por este trabalho atingiram os objetivos de texturização superficial, modificando-se as características físicas e químicas das amostras de TiCp e de Ti-6Al-4V-ELI, de forma que, os eventos celulares intermediários observados, sugerem o favorecimento das atividades osteoblásticas envolvidas na osseointegração.

Contudo, mais estudos em modelos in vivo são necessários para o completo entendimento das vantagens e desvantagens dessas modificações superficiais, afim de que, seja elucidado seu devido papel na osseointegração, promovendo novas perspectivas no âmbito da Implantodontia.

## REFERÊNCIAS\*

- 1- Mas-Moruno C, Su B, Dalby MJ. Multifunctional Coatings and Nanotopographies: Toward Cell Instructive and Antibacterial Implants. *Adv Healthc Mater.* 2019; 8(1): 1801103.
- 2- Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med.* 1997; 8: 341–47.
- 3- Chen Q, Thouas GA. Metallic implant biomaterials. *Mater Sci Eng R Reports.* 2015; 87: 1-57.
- 4- Branemark PI. Tissue-Integrated Prostheses Osseointegration *Clin Dent.* 1985; 54(4): 611-12.
- 5- Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer.* 2000; 88(S12): 2961-78.
- 6- Zhou C, Chen YQ, Zhu YH, Lin GF, Zhang LF, Liu XC et al. Antiadipogenesis and Osseointegration of Strontium-Doped Implant Surfaces. *J Dent Res.* 2019 98(7): 795-802.
- 7- Oliveira NTC, Guastaldi AC. Electrochemical stability and corrosion resistance of Ti-Mo alloys for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2009; 5(1): 399-405.
- 8- Orozco C, Maalouf NM. Safety of Bisphosphonates. *Rheum Dis Clin North Am.* 2012; 38(4): 681-705.
- 9- Niinomi M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Mater Sci Eng A.* 1998; 243(1-2): 231-36.
- 10- Conforto E, Caillard D, Müller L, Müller FA. The structure of titanate nanobelts used as seeds for the nucleation of hydroxyapatite at the surface of titanium implants. *Acta Biomater.* 2008; 4(6): 1934-43.
- 11- Sela J, Gross UM, Kohavi D, Shani J, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Primary mineralization at the surfaces of implants. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11 (4): 423-36.
- 12- Aparicio C, Gil FJ, Fonseca C, Barbosa M, Planell JA. Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials.* 2003; 24(2): 263-73.

---

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

- 13- Gotfredson K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard LT, Hjorting-Hansen E. Anchorage of TiO<sub>2</sub>-blasted, HA-coated, and machined implants: An experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res.* 1995; 29 (10): 1223-31.
- 14- Elias CN, Lima JHC, Valiev R, Meyers MA. Biomedical applications of titanium and its alloys. *JOM.* 2008; 60: 46-9. <https://doi.org/10.1007/s11837-008-0031-1>.
- 15- Lausmaa J. Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. *J Electron Spectros. Relat. Phenomena.* 1996; 2048 (95): 02530-8.
- 16- Basu B, Nath S. Fundamentals of biomaterials and biocompatibility. In: Basu B, Katti DS, Kumar A, Editors. *Advanced biomaterials: fundamentals, processing and applications.* Hoboken: John Wiley & Sons; 2009; p. 1-18.
- 17- Pang S, He Y, He P, Luo X, Guo Z, Li H. Fabrication of two distinct hydroxyapatite coatings and their effects on MC3T3-E1 cell behavior. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2018; 171: 40-8.
- 18- Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003; 67 (8): 932-49.
- 19- Bello SA, De Jesús-Maldonado I, Rosim-Fachini E, Sundaram PA, Difffoot-Carlo N. In vitro evaluation of human osteoblast adhesion to a thermally oxidized  $\gamma$ -TiAl intermetallic alloy of composition Ti-48Al-2Cr-2Nb (at.%). *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21(5): 1739-50.
- 20- Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. *Prog Mater Sci.* 2009; 54: 397-425.
- 21- Cattoni D, Ferrari C, Lebedev L, Pazos L, Svoboda H. Effect of Blasting on the Fatigue Life of Ti-6Al-7Nb and Stainless Steel AISI 316 LVM. *Procedia Mater Sci.* 2012; 60: 46-9.
- 22- Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1999; 45(2): 75-83.
- 23- Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials.* 2006; 27(15):2907-15.
- 25- Le Guehennec L, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater.* 2008; 4 (3): 535-43.
- 26- Raphel J, Holodniy M, Goodman SB, Heilshorn SC. Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. *Biomaterials.* 2016; 84: 301-314.
- 27- Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007; 23 (7): 844-54.



- 28- Bagno C, Di Bello. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2004; 15(9): 935-19.
- 29- Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Bioactive metals: Preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med*. 2004; 51: 294-99.
- 30- Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med*. 1997; 8: 341-47.
- 31- Tsimbouri PM, Fisher L, Holloway N, Sjoström T, Nobbs AH, Meek RMD, Su B, Dalby MJ. Osteogenic and bactericidal surfaces from hydrothermal titania nanowires on titanium substrates. *Sci Rep*. 2016; 6: 36857.
- 32- Adachi JD, Saag KG, Delmas PD, Liberman UA, Emkey RD, Seeman E et al. Two-year effects of alendronate on bone mineral density and vertebral fracture in patients receiving glucocorticoids: A randomized, double-blind, placebo-controlled extension trial. *Arthritis Rheum*. 2001; 44 (1): 202-11.
- 33- Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: Risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 64(12): 1771-79.
- 34- Green J, Czanner G, Reeves G, Watson J, Wise L, Beral V. Oral bisphosphonates and risk of cancer of oesophagus, stomach, and colorectum: Case-control analysis within a UK primary care cohort. *BMJ*. 2010; 341: c4444.
- 35- Lazarovici TS, Yahalom R, Taicher S, Elad S, Hardan I, Yarom N. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: A Single-Center Study of 101 Patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67(4): 850-55.
- 36- Maïmoun L, Brennan TC, Badoud I, Dubois-Ferriere V, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate improves implant osseointegration, *Bone*. 2010; 46 (5): 1436-41.
- 15- Blake GM, Fogelman I. Strontium ranelate: a novel treatment for postmenopausal osteoporosis: a review of safety and efficacy. *Clin Interv Aging*. 2006; 1(4): 367-75.
- 37- Jakobsen T, Bechtold JE, Jensen T, Marianne T, Medical M. Increases Fixation of Hydroxy-Coated. *Implants*. 2019; 35(5): 974-79.
- 38- Blake GM, Fogelman I. Strontium ranelate: a novel treatment for postmenopausal osteoporosis: a review of safety and efficacy. *Clin Interv Aging*. 2006; 1(4): 367-75.
- 39- Li Y, Feng G, Gao Y, Luo E, Liu X, Hu J. Strontium ranelate treatment enhances hydroxyapatite-coated titanium screws fixation in osteoporotic rats. *J Orthop Res*. 2010; 28(5): 578-82.
- 40- Fernandes G, Vanyo ST, Alsharif SBA, Andreana S, Visser MB, Dziak R. Strontium Effects on Human Gingival Fibroblasts. *J Oral Implantol*. 2019; 45: 274-80.
- 41- Buehler J, Chappuis P, Saffar JL, Tsouderos Y, Vignery A. Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone*. 2001; 29(2): 176-79.

43- Oliveira NTC, Aleixo G, Caram R, Guastaldi AC. Development of Ti-Mo alloys for biomedical applications: Microstructure and electrochemical characterization. *Mater Sci Eng A*. 2007; 50(4): 938-45.

44- Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl R, Geis-Gerstorfer J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials*. 2004; 25(18): 4087-4103.

## APÊNDICE A – Metodologia Detalhada da Publicação 1

### Confecção dos Discos

Foi utilizada uma haste cilíndrica de Ti comercialmente puro (ASTM Grau 2; Realum, Brasil), de 11,11 mm de diâmetro e 100 cm de comprimento, para obtenção dos discos de  $\approx 1,5$  mm de espessura. Os discos foram polidos, progressivamente, com lixas de carbeto de silício, nas granulações de 400, 600, 800, 1.200, 1.500 e 2.500, sob irrigação abundante com etanol a 92,8%, até que a superfície de Ti assumisse um aspecto espelhado. Os discos foram lavados em ultrassom, com etanol e água deionizada, e posteriormente submetidas ao tratamento com NaOH concentrado a 5 M, a 60 °C, por 24 h<sup>7</sup>. Em seguida, as amostras tratadas com NaOH receberam o tratamento hidrotérmico em autoclave com  $\text{Sr}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  a 60 mM, a 121 °C ( $\pm 2$  °C) e 1,0 a 1,5 Kgf/cm<sup>2</sup>, por 1 h.

### Descontaminação das amostras

As amostras foram acondicionadas dentro de um fluxo laminar, à 50 mm de uma lâmpada germicida (30 W, Philips, Alemanha), e irradiadas com luz ultravioleta (UV-C;  $\lambda = 254$  nm) durante um período total de 1 hora, 30 minutos de ambos os lados.

**Figura 1** - Confecção das amostras de Ti



Fonte: Elaboração própria.

### Caracterização Física e Química

#### Avaliação da morfologia e rugosidade superficial

Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEG; JEOL 7500F, Japão) para a análise das características morfológicas das amostras (n=3 amostras por grupo). A rugosidade da superfície das amostras foi analisada por meio de um perfilômetro (Mitutoyo SJ 400, Tóquio, Japão) com resolução de 0,01  $\mu\text{m}$ , intervalo (*cut-off length*) de 0,8 mm, comprimento transversal de 2,4 mm, com uma sonda com ponta de

diamante de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e velocidade de leitura de 0,5 mm/s. Foram realizadas 4 leituras em cada corpo de prova (em um total de 4 amostras por grupo), e avaliados os parâmetros Ra (rugosidade média aritmética) e Rz (altura máxima do perfil de rugosidade).

### **Avaliação da composição química**

Três amostras de cada grupo foram analisadas por meio do equipamento MEV-FEG, avaliando-se 3 regiões diferentes da mesma amostra. Esta análise qualitativa, demonstrou os elementos químicos presentes na superfície das amostras, por meio da emissão de raios-X (XPS), e pela análise do estado elétrico dos elementos químicos detectados por EDS.

### **Avaliação do ângulo de contato**

As superfícies das amostras foram analisadas em um goniômetro (Ramé-Hart, EUA), utilizando-se a água (polar) e diiodometano (apolar), por meio do método de gotejamento sésil<sup>8</sup>. Uma gota de 3  $\mu\text{L}$  foi dispensada sobre a superfície de Ti, e o ângulo de contato formado entre a superfície de Ti e a superfície externa da gota foi determinado por meio de 20 mensurações realizadas a cada 0,001 s. Este procedimento foi repetido 9 vezes, e o ângulo de contato médio, com ambos os líquidos, foi determinado por meio do *software* DROPimage CA (Ramé-Hart, EUA).

## **Caracterização Biológica**

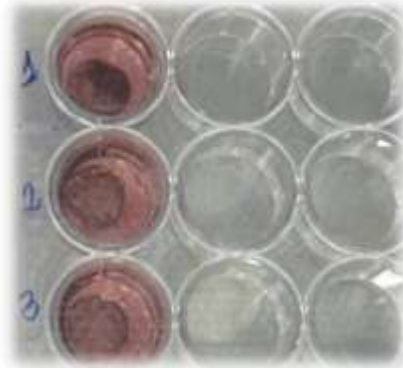
### **Plaqueamento celular**

As avaliações da biocompatibilidade das diferentes superfícies de titânio, foram feitas por meio de análises do comportamento da linhagem celular de pré-osteoblastos MC3T3-E1 (BCRJ, Brasil), cultivados em contato direto com as amostras.

As células foram semeadas sobre os discos em uma densidade de plaqueamento de  $2 \times 10^4$  células/ mL de meio de cultura. As células foram cultivadas sobre as amostras acondicionadas em placas de 24 poços, mantidas em meio de cultura  $\alpha$ -MEM em proporções de 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de streptomina, 50  $\mu\text{g/mL}$  de ácido ascórbico e 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato, a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar atmosférico.

Após o período de 24 horas, os discos de titânio foram transferidos para um novo poço da placa de cultura celular, para evitar interferências nos resultados. Cada um dos experimentos descritos a seguir foram realizados em triplicata (n=3) com 3 repetições independentes.

**Figura 2** - Plaqueamento das células sobre os discos de Ti



Fonte: Elaboração própria.

### **Avaliação da viabilidade celular**

Para a análise da proliferação celular, as células foram incubadas com o reagente Alamar Blue<sup>®</sup>, diluído a 10% em meio de cultura  $\alpha$ -MEM, mantidas por 4 h, a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico.

Posteriormente, 150  $\mu$ L do Alamar Blue<sup>®</sup> condicionado foi transferido para placas de 96 poços (Corning<sup>®</sup>). As mensurações do sobrenadante Alamar Blue<sup>®</sup> foram realizadas em um espectrofotômetro (Synergy H1, BioTek<sup>™</sup>, Winooski, VT, EUA) a 570/600 nm, nos períodos de 1, 3, 7, 10, 14 e 21 de cultivo celular.

**Figura 3** - Redução do corante Alamar Blue<sup>®</sup> pelas células sobre os discos



Fonte: Elaboração própria.

### **Avaliação da morfologia celular**

As células foram cultivadas sobre os discos de titânio pelo período de 3 dias, sendo posteriormente fixadas pelas soluções de glutaraldeído a 2 % (Sigma, EUA) diluído em  $\alpha$ MEM puro (Gibco) e glutaraldeído a 2% (Sigma, EUA) diluído em tampão cacodilato a 0,1M (Sigma, EUA). Após a fixação celular as amostras foram lavadas com PBS (phosphate buffered saline - Gibco) e desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico. A secagem dos discos de titânio foi feita em um dissecador a vácuo recebendo ao final do processamento a deposição de uma camada de 6 nm ouro para análise em um microscópio eletrônico de varredura - MEV (JEOL JSM-6610LV, Japão). Cinco micrografias de cada amostra foram utilizadas para a análise.

### **Avaliação da adesão e espraiamento celular**

Para a avaliação da adesão e espraiamento celular as células precursoras osteoblásticas foram cultivados sobre as amostras, e avaliadas nos períodos de 2h e 4h, por meio de ensaios de fluorescência direta com faloidina conjugada com o corante Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes), para análise do citoesqueleto celular e com o corante dihidroclorato de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Molecular Probes) para marcação nuclear. Cinco micrografias de cada amostra foram utilizadas para a análise.

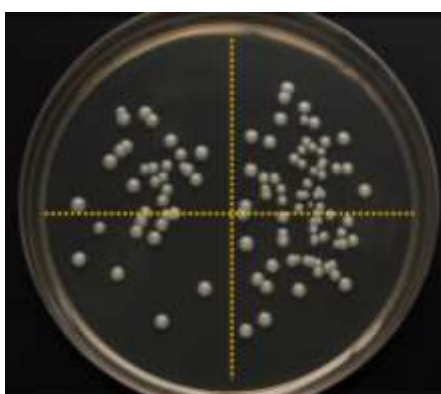
### **Cultivo do s. Aureus**

Para o preparo do inóculo, a cepa *S. aureus* (ATCC 33591) foi semeada em placas de Petri (Corning®) contendo meio ágar Mueller Hinton (Himedia, Mumbai, Índia) e incubada a 37 °C, por 48 h. Em seguida, uma alçada da cepa recém cultivada foi transferida para frascos contendo 20 mL de meio de cultura Trypticase Soy Broth (TSB; Sigma, St Louis, MO, EUA) para o crescimento celular a 37 °C, por 21 h. As células bacterianas da cultura resultante foram colhidas, centrifugadas com PBS (Gibco®) a 4.000  $\times$  g por 5 min, e ressuspendidas em meio TSB. A densidade óptica do inóculo foi determinada e padronizada por meio de espectrofotômetro a uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL.

### **Método UFC/ML**

Após a remoção das células não aderentes, os discos de Ti foram transferidos para um tubo Falcon contendo 10 mL de PBS e, em seguida, agitados vigorosamente por 1 min para o desprendimento e a ressuspensão das células aderidas. As suspensões celulares foram submetidas a diluições seriadas (de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ), e uma alíquota de 25  $\mu$ L de cada diluição foi plaqueada em meio ágar Mueller Hinton (Himedia), em duplicata. As células foram incubadas a 37 °C por 48 h e, então, o número de colônias foi contado e expresso como UFC/mL.

**Figura 4** - Contagem das colônias (UFC/mL)



Fonte: Elaboração própria.

#### **Avaliação da adesão do *S. Aureus***

Alíquotas de 2 mL da suspensão de *S. aureus*, padronizada a  $1 \times 10^7$  células/mL, foram aplicadas à superfície dos discos de Ti e incubadas a 37 °C em agitador orbital a 75 rpm. Transcorrido o período de adesão inicial, isto é, 90 min, as células não aderentes foram removidas por meio de lavagem com 2 mL de PBS, e a adesão inicial de *S. aureus* foi determinada por meio da contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). As amostras de Ti em meio de cultura TSB constituíram o controle negativo do experimento. Os experimentos foram realizados em duplicata, em três ocasiões independentes.

#### **Morfologia, colonização e viabilidade de *S. Aureus***

Após o período de adesão inicial e lavagem com PBS, o espriamento do microrganismo foi avaliado em MEV. A viabilidade celular foi determinada por meio do Kit de Viabilidade BacLight Live/Dead (Invitrogen®), em microscópio confocal de fluorescência a laser (CLSM; Zeiss LSM 800). Neste ensaio, células viáveis e não-

viáveis são representadas por marcações na coloração verde e vermelho, respectivamente.



## APÊNDICE B - Metodologia Detalhada da Publicação 2

### Obtenção das Amostras

As amostras dos Grupos A, B e C, foram cortadas pelo método a laser a partir de uma barra de Ti cp (Grupo A) ou de Ti-6Al-4V-ELI - ASTM 136 (Grupos B e C), todas com 3 mm de espessura, e 10mm de diâmetro. Todas as amostras foram polidas com lixas, até chegarem às lixas com granulação de 1500. Após o polimento as amostras foram mergulhadas em água deionizada, para a limpeza dos detritos dos espécimes.

### Esterilização

Previamente aos testes celulares, todas as amostras foram esterilizadas por meio da radiação gama (*EMBRARAD, Brasil*).

**Figura 1** - Confeção das amostras de Ti cp e Ti-Al-4V



Fonte: Elaboração própria.

### Caracterização Física

#### Avaliação da rugosidade superficial e da área efetiva

Os parâmetros da análise da rugosidade superficial, e as medidas de área efetiva das amostras foram analisadas por meio de um microscópio confocal a laser (OLYMPUS – LEXT OLS 4000). Foram obtidas imagens em magnificação de 30x, com as reconstruções das superfícies estudadas em formato 3D. Após a obtenção das imagens, as características das amostras foram expressas em formato de gráficos, com as medidas tabeladas pelo próprio programa equipamento. Para este ensaio foram avaliadas 3 amostras por grupo.

### Caracterização Biológica

### **Cultivo celular**

As células foram cultivadas em meio de cultura celular do tipo  $\alpha$ -MEM, suplementado com 10% de FBS, 100 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, em placas de 100 mm específicas para a cultura de células, mantidas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico.

### **Plaqueamento celular**

Após atingirem a confluência em torno de 80%, as mesmas eram repicadas e posteriormente plaqueadas entre a segunda e terceira passagem (P2 e P3), em uma concentração de  $2 \times 10^4$  sobre os discos de titânio.

Os discos com as células semeadas na camada superficial foram acondicionadas individualmente, em placa de cultura celular de 24 poços, e mantidos em meio  $\alpha$ -MEM com 10% de FBS, 100 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, suplementado com 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 10 mmol.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -glicerofosfato, para estímulo da diferenciação osteoblástica. Após o período de adesão celular, 24 horas, os discos foram transferidos para uma placa com um novo poço de cultura.

### **Análise da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada durante os períodos de 1, 3, 7, 10, 14 e 21 dias de incubação por meio do reagente Alamar Blue (Molecular Probes, EUA). Os discos de titânio foram incubados individualmente em uma placa de 24 poços, contendo 1 mL da solução de trabalho do Alamar Blue ( $\alpha$ -MEM com 10% de Alamar Blue). Foram utilizadas como controle negativo a própria solução de trabalho do Alamar Blue. Após o tempo de incubação de 4 h, alíquotas de 150  $\mu$ L foram coletadas de cada amostra, transferidas para uma placa de 96 poços e realizada a leitura em um espectrofotômetro em comprimentos de onda de 570 e 600 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata, com três repetições em momentos distintos.

### **Análise do espriamento e da morfologia celular**

O espriamento e a morfologia celular foram avaliadas no terceiro dia de cultivo das células, em contato direto com as superfícies de TiCP e Ti-6Al-4V, por meio de MEV e fluorescência direta, respectivamente.

Para avaliação do espriamento celular por meio das imagens obtidas pelo ensaio de MEV, as células aderidas aos discos de titânio foram fixadas com soluções de glutaraldeído a 2 % (Sigma, EUA) em  $\alpha$ MEM puro (Gibco, EUA) e glutaraldeído a 2% (Sigma, EUA) em tampão cacodilato 0,1M (Sigma, EUA), lavadas em PBS (phosphate buffered saline) e desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico. Após secagem em dissecador a vácuo as amostras receberam deposição de uma camada de 6 nm ouro para análise em MEV. Os ensaios foram realizados em triplicado, em três momentos distintos. Três micrografias de cada amostra foram utilizadas para a análise.

Para análise das imagens por fluorescência direta as células foram coradas com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), para marcação do citoesqueleto, associada à marcação do núcleo celular com o corante à base de dihidrocloro de 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Molecular Probes). Para a análise foram realizadas 3 imagens de cada amostra, por meio de microscópio eletrônico confocal a laser (AMG, Evos fl<sup>®</sup>). Os experimentos foram realizados em triplicata, com 3 repetições em ocasiões distintas, sendo que 3 micrografias foram realizadas de cada amostra.

### **Expressão gênica**

Para avaliação da expressão de genes de proteínas relacionadas à osteogênese foram avaliados por meio de PCR-Array (Qiagen, EUA) 84 genes relacionados à diferenciação osteogênica (Figura 1), nos períodos de 7 e 14 dias. A extração e purificação do RNA total das células cultivadas sobre as amostras, foram realizadas pelo kit Rneasy MiniKit (Qiagen, EUA) segundo as instruções do fabricante. A primeira cadeia de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada utilizando-se 1  $\mu$ g do RNA total e o kit de Primeira Cadeia RT2 (Qiagen, EUA). Quantidades idênticas de cDNA e do Master Mix SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Mastermix (Qiagen, EUA) foram distribuídas em poços individuais das placas de 96 poços do kit RT<sup>2</sup> Profiler (Qiagen, EUA) contendo as porções dos genes específicos anteriormente escolhidos. O experimento foi realizado com as amostras em triplicata, em um único momento.

Para análise dos dados obtidos, os valores foram exportados online para o site da empresa (<http://www.qiagen.com/geneglobe>), e a normalização dos dados realizados segundo os parâmetros da mesma. Os resultados são gerados em fold-

change utilizando-se o método do delta Ct, calculado e relacionado aos genes de interesse, com as médias dos genes de referência.

**Não autorizo a reprodução deste trabalho até 30/03/2022**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara 30 de março de 2020.**

**Mariana Aline Cominotte**