



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CAROLINA SIMÃO ALBANO

**EFEITOS BIOLÓGICOS DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE
TiO₂ COM ALENDRONATO DE SÓDIO E ALBUMINA (BSA)**

BOTUCATU

2020

CAROLINA SIMÃO ALBANO

**EFEITOS BIOLÓGICOS DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE
TiO₂ COM ALENDRONATO DE SÓDIO E ALBUMINA (BSA)**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do Título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *campus* Botucatu.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho

Coorientador: Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

BOTUCATU

2020

A326e	Albano, Carolina Simão Efeitos biológicos da funcionalização de superfícies de TiO₂ com Alendronato de Sódio e Albumina (BSA) / Carolina Simão Albano. -- Botucatu, 2020 89 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu Orientador: Paulo Noronha Lisboa Filho Coorientador: Willian Fernando Zambuzzi 1. Biomaterial. 2. Dióxido de titânio. 3. Superfícies. 4. Biocompatibilidade. 5. Osseointegração. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Cleuza e Luis, por sempre me proporcionarem todo o amor e apoio necessário.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da minha vida, por sempre ter me dado força e coragem e por ter conduzido meu caminho até aqui.

Aos meus amados pais Cleuza e Luis, por todo amor, compreensão e motivação durante toda minha vida. Deus me presenteou com pais maravilhosos que nunca mediram esforços para que meu estudo fosse possível e que me inspiram todos os dias pela dedicação que sempre tiveram. Palavras nunca serão suficientes para agradecer vocês.

Ao meu irmão Luiz Gustavo, por ser minha fonte de inspiração, meu maior exemplo desde criança, meu companheiro e por sempre estar presente torcendo por mim e acompanhando os meus passos.

A minha cunhada Luciana, que além de ser muito especial para mim, contribuiu de maneira incondicional desde o início para a realização deste trabalho. Agradeço todos os ensinamentos, a ajuda, a paciência e a amizade durante esses anos.

A minha avó Abigail, aos meus tios Flávia, Tiago e José Paulo, aos meus primos Mariane e Lucas, por sempre me receberem tão bem, por todo amor, carinho e cuidado que tiveram comigo durante toda minha vida e especialmente durante o tempo que fiquei em Botucatu.

Aos amigos de Barra Bonita e Igarapu do Tietê, por todos os momentos inesquecíveis, pelos inúmeros anos juntos e por sempre me apoiarem nessa caminhada.

A amiga Geórgia Feltran, presente que Botucatu me deu, por todos os momentos, risadas, comilanças, conselhos. Obrigada pela cooperação durante a realização deste trabalho e por ter me ensinado tanto. Sentirei saudades.

Ao amigo Marcel Ferreira, que me ensinou muitas coisas e me ajudou muito neste trabalho. Obrigada pelas risadas e por tudo sempre. Sentirei sua falta.

A amiga Elaine Morato, que é muito importante na minha vida. Obrigada pelas conversas, pela amizade e pelos cafés. Voltarei pra te visitar, com certeza.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho, pela oportunidade, pela compreensão, por sempre confiar e acreditar em mim, pelos inúmeros ensinamentos e por nunca ter me deixado desistir, sempre me encorajando.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi, por todo apoio, aprendizado, experiências e por ter me recebido de portas abertas em seu grupo. Aprendi muito com você.

Aos membros do Laboratório de Materiais Avançados e Nanotecnologia, da Faculdade de Ciências da Unesp/Bauru, pelo suporte e toda ajuda de sempre. Em especial a Marcela (Teteia), pela amizade e por sempre ter me recebido tão bem em sua casa.

Aos membros do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular (LaBIO), do Instituto de Biociências da Unesp/Botucatu, por terem me acolhido desde o primeiro dia, pelo companheirismo, ensinamentos e inúmeras discussões produtivas. Em especial ao Anderson, Geórgia e Marcel, que me ajudaram desde o início.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Biociências da Unesp/Botucatu e todos os colegas e funcionários que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Em especial, a minha colega de disciplinas, Dafne Camargo.

A agência de fomento FAPESP pelo apoio financeiro através dos processos 2014/22689-3, 2017/02366-3, 2017/15035-5.

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

RESUMO

O dióxido de titânio (TiO_2) tem sido utilizado como modificador de superfície de implantes, possibilitando um aperfeiçoamento na resistência à tribocorrosão do material e aumento da bioatividade dos óxidos, apresentando resultados favoráveis quando em contato com o tecido vivo. Apesar da biocompatibilidade deste óxido ser reconhecida, ainda existem muitos aspectos inexplorados sobre os mecanismos de imobilização entre as proteínas e a superfície do material que induzem à osseointegração do implante. No entanto, entre diferentes estratégias, a superfície de TiO_2 pode ser prontamente funcionalizada através dos grupos hidroxila com grupos bifuncionais, tais como bisfosfonatos e proteínas, os quais podem melhorar a osseointegração do implante. No presente estudo o bisfosfonato em questão é o alendronato de sódio, um fármaco utilizado no tratamento de doenças associadas ao aumento da reabsorção óssea, como a osteoporose. A albumina é a proteína de interesse que se associa aos processos biológicos iniciais após a incorporação do implante. A fim de analisar a morfologia e a rugosidade superficial, foram realizadas técnicas de caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Óptica Confocal, respectivamente; além do ângulo de contato que avaliou a molhabilidade das superfícies. As superfícies modificadas com TiO_2 foram analisadas por Difração de Raios X, a qual indicou a formação da fase cristalina rutilo. Além disso, após a imobilização de alendronato e BSA, a técnica de XPS indicou uma funcionalização eficiente da superfície. Quando a superfície de um material com aplicações biomédicas é modificada, alguns ensaios *in vitro* são necessários para a avaliação da toxicidade celular, permitindo averiguar os possíveis efeitos durante a adesão e a proliferação de células quando colocadas em contato direto e indireto com o material. A biocompatibilidade das superfícies funcionalizadas foi analisada através do comportamento de adesão de pré-osteoblastos e fibroblastos nas amostras. Os resultados mostraram uma melhora significativa em relação à adesão e viabilidade celular. Além disso, o remodelamento da matriz extracelular é um pré-requisito importante para os estágios iniciais da adesão celular aos biomateriais, que foram testados pela avaliação das atividades enzimáticas das metaloproteinases da matriz (MMPs) e das expressões gênicas. Por fim, os dados expressaram um panorama da diferenciação osteoblástica como um comportamento adaptativo quando as células entraram em contato com as superfícies biofuncionalizadas por 24 horas. De maneira geral, os resultados mostraram um interessante desempenho osteogênico das células que responderam às superfícies com alendronato de sódio e BSA, no entanto, análises *in vivo* são necessárias para melhor considerar essas superfícies em ensaios clínicos na área biomédica.

Palavras-chave: Biomaterial, Dióxido de titânio, Superfícies, Biocompatibilidade, Osseointegração.

ABSTRACT

Titanium dioxide (TiO₂) has been used as an implant surface modifier, enabling an improvement in the material's tribocorrosion resistance and increased oxide bioactivity, showing favorable results when in contact with living tissue. Although the biocompatibility of this oxide is recognized, there are still many unexplored aspects about the mechanisms of immobilization between proteins and material surface that induce implant osseointegration. However, among different strategies, the TiO₂ surface can be readily functionalized through hydroxyl groups with bifunctional groups, such as bisphosphonates and proteins, which can improve implant osseointegration. In the present study the bisphosphonate in question is sodium alendronate, a drug used to treat diseases associated with increased bone resorption, such as osteoporosis. Albumin is the protein of interest that is associated with early biological processes following implant incorporation. In order to analyze morphology and surface roughness, Scanning Electron Microscopy and Confocal Optical Microscopy characterization techniques were performed, respectively; besides the contact angle that evaluated the wettability of the surfaces. TiO₂-modified surfaces were analyzed by X-ray Diffraction, which indicated the formation of rutile crystalline phase. In addition, after immobilization of alendronate and BSA, the XPS technique indicated efficient surface functionalization. When the surface of a material with biomedical applications is modified, some in vitro assays are required to assess cell toxicity, allowing to investigate the possible effects during cell adhesion and proliferation when placed in direct and indirect contact with the material. The biocompatibility of functionalized surfaces was analyzed by the adhesion behavior of pre-osteoblasts and fibroblasts in the samples. The results showed a significant improvement regarding adhesion and cell viability. In addition, extracellular matrix remodeling is an important prerequisite for the early stages of cell adhesion to biomaterials, which were tested by evaluating the enzymatic activities of matrix metalloproteinases (MMPs) activities and gene expression. Finally, the data expressed an overview of osteoblastic differentiation as an adaptive behavior when cells came into contact with biofunctionalized surfaces for 24 hours. Overall, the results showed an interesting osteogenic performance of cells that responded to surfaces with sodium alendronate and BSA, however, in vivo analysis is needed to better consider these surfaces in clinical trials in the biomedical field.

Keywords: Biomaterial, Titanium dioxide, Surfaces, Biocompatibility, Osseointegration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Disposição tetragonal das fases anatase **(a)** e rutilo **(b)**. Os átomos de Ti estão representados pelas esferas cinzas e os átomos de oxigênio pelas esferas vermelhas. Fonte: adaptado de BOURIKAS; KORDULIS; LYCOURGHOTIS, 2014. 3
- Figura 2.** Disposição ortorrômbica da fase brookita. Fonte: MO; CHING, 1995. 4
- Figura 3.** Estágios iniciais das comunicações bioquímicas que sucedem a exposição da superfície do óxido ao ambiente biológico. Hidroxilação e hidratação do óxido de titânio **(a)**. Adsorção de cátions e ânions constituintes do fluido corporal, principalmente cálcio e fosfato **(b)**. Adsorção de biomoléculas, fixação de plaquetas e formação de rede de fibrina em contato com o sangue **(c)**. Fonte: adaptado de BRUNETTE et al., 2001... 6
- Figura 4.** Estrutura tridimensional da HSA com seus domínios homólogos. Fonte: PDB id 1AO6. 7
- Figura 5.** Diferentes estruturas conformacionais da BSA (formas N, F e E). Fonte: adaptado de CARTER; HO, 1994..... 8
- Figura 6.** Estrutura química geral dos bisfosfonatos. Fonte: adaptado de FARRELL et al., 2018..... 9
- Figura 7.** Rotas pelas quais os bisfosfonatos podem inibir a atividade de osteoclastos durante reabsorção óssea. Fonte: adaptado de (ROGERS et al., 2000). 10
- Figura 8.** Diferentes etapas do preparo dos substratos metálicos. Fonte: produzido pelo autor. 12
- Figura 9.** Processo de deposição do filme de TiO_2 nas superfícies. Fonte: produzido pelo autor..... 13
- Figura 10.** Design da metodologia experimental do contato direto. Os pré-osteoblastos e fibroblastos foram depositados nas superfícies modificadas dos discos por 24 horas e,

em seguida, as amostras foram coletadas para as análises. Fonte: produzido pelo autor.
..... 16

Figura 11. Design da metodologia experimental do contato indireto. Os discos de titânio com suas superfícies modificadas foram incubados em meio de cultura RPMI isento de Soro Fetal Bovino por 24 horas. O meio condicionado pelas amostras foi utilizado para o tratamento de pré-osteoblastos e fibroblastos por 24 horas e, em seguida, as amostras foram coletadas para as análises. Fonte: produzido pelo autor..... 17

Figura 12. Difratometria de Raios X (DRX) para o filme de TiO_2 , onde é possível observar a presença de picos relacionados a fase cristalina rutilo. 21

Figura 13. Imagem das superfícies por Microscopia Eletrônica de Varredura para o substrato polido de Ti Cp4 lixado até granularidade 800 **(a)** e para o filme fino nanoestruturado de TiO_2 depositado **(b)**. 22

Figura 14. Rugosidade superficial medida por Microscopia Óptica Confocal de todos os grupos com as superfícies modificadas. 23

Figura 15. Imagem de Microscopia Óptica Confocal para a amostra de Ti Cp4 lixada em 2D **(a)** e 3D **(b)**..... 23

Figura 16. Imagem de Microscopia Óptica Confocal para a amostra de TiO_2 em 2D **(a)** e 3D **(b)**. 24

Figura 17. Imagem de Microscopia Óptica Confocal para a amostra de TiO_2 +ALN em 2D **(a)** e 3D **(b)**. 24

Figura 18. Imagem de Microscopia Óptica Confocal para a amostra de TiO_2 +BSA em 2D **(a)** e 3D **(b)**. 24

Figura 19. Imagem de Microscopia Óptica Confocal para a amostra de TiO_2 +ALN+BSA em 2D **(a)** e 3D **(b)**. 25

Figura 20. Medidas de Ângulo de Contato (a) e de Energia de Superfície (b) para amostras Ti Cp4, TiO ₂ , TiO ₂ +ALN, TiO ₂ +BSA e TiO ₂ +ALN+BSA.	26
Figura 21. Espectro <i>survey</i> de XPS para a amostra de TiO ₂	27
Figura 22. Espectro de alta resolução do Ti 2p (a) e espectro de alta resolução do O 1s (b) , ambos para o filme de TiO ₂	28
Figura 23. Espectro <i>survey</i> para a amostra de TiO ₂ +ALN.....	28
Figura 24. Espectro de alta resolução do O 1s (a) , espectro de alta resolução do C 1s (b) , espectro de alta resolução do N 1s (c) e espectro de alta resolução para P 2p (d) , todos para a amostra de TiO ₂ +ALN.	30
Figura 25. Espectro <i>survey</i> para a amostra TiO ₂ +BSA.....	31
Figura 26. Espectro de alta resolução do O 1s (a) , espectro de alta resolução do C 1s (b) e espectro de alta resolução do N 1s (c) , todos para a amostra de TiO ₂ +BSA.	32
Figura 27. Espectro <i>survey</i> para a amostra TiO ₂ +ALN+BSA.	33
Figura 28. Espectro de alta resolução do O 1s (a) , espectro de alta resolução do C 1s (b) e espectro de alta resolução do N 1s (c) , todos para a amostra de TiO ₂ +ALN+BSA.	34
Figura 29. Diagrama esquemático que demonstra os possíveis modelos para a fixação das moléculas de alendronato. O alendronato pode ligar-se através de ligação de hidrogênio (a) , ligação monodentada (b) ou unidades de ligações bidentadas (c) . Fonte: adaptado de TRINO et al., 2018.	35
Figura 30. Ensaios de adesão celular por Cristal Violeta (a) e ensaio de viabilidade celular por MTT (b) nas diferentes superfícies em contato direto pelo período de 24 horas. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos	

independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. ** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$). 37

Figura 31. Expressão gênica de genes relacionados à adesão celular: Integrina- $\beta 1$ (a), Fak (b), Src (c), Pp2A (d) e Cofilina (e), em contato direto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. ** ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$). 39

Figura 32. Expressão gênica de genes envolvidos no rearranjo da matriz extracelular: Timp2 (a), Mmp2 (b) e Mmp9 (c), em contato direto, utilizando a tecnologia q-PCR. As análises para a atividade enzimática das MMPs foram realizadas utilizando a técnica de Zimografia. Degradações da gelatina demonstrada por SDS-PAGE revelaram a faixa de atividade relativa para as gelatinases (d), além das análises estatísticas para as atividades de Mmp2 (e, g, i) e Mmp9 (f, h, j). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * e ** ($p < 0,05$), *** e **** ($p < 0,001$). 40

Figura 33. Expressão gênica de genes relacionados à diferenciação celular: Runx2 (a), Alp (b), Bsp (c), Spp1 (d), Bglap2 (e) e Dmp1 (f) em contato direto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * e ** ($p < 0,05$), *** e **** ($p < 0,001$). 42

Figura 34. Ensaios de adesão celular por Cristal Violeta (a) e ensaio de viabilidade celular por MTT (b) nas diferentes superfícies em contato indireto pelo período de 24 horas. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$). 43

Figura 35. Expressão gênica de genes relacionados à adesão celular: Integrina- $\beta 1$ (a), Fak (b), Src (c), Pp2A (d) e Cofilina (e), em contato indireto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos

independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. ** ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$). 45

Figura 36. As alterações morfológicas são acompanhadas pelo rearranjo dinâmico do citoesqueleto. Microscopia Óptica Confocal de Fluorescência marcando a proteína B-actina mostra o citoesqueleto das células em Ti (**a, f, k**), TiO_2 (**b, g, l**), $\text{TiO}_2 + \text{ALN}$ (**c, h, m**), $\text{TiO}_2 + \text{BSA}$ (**d, i, n**) e $\text{TiO}_2 + \text{ALN} + \text{BSA}$ (**e, j, o**). As barras de escala são 50 μm 46

Figura 37. Expressão gênica de genes envolvidos no rearranjo da matriz extracelular: Timp2 (**a**), Mmp2 (**b**) e Mmp9 (**c**), em contato indireto, utilizando a tecnologia q-PCR. As análises para a atividade enzimática das MMPs foram realizadas utilizando a técnica de Zimografia. Degradações da gelatina demonstrada por SDS-PAGE revelaram a faixa de atividade relativa para as gelatinases (**d**), além das análises estatísticas para as atividades de Mmp2 (**e, g, i**) e Mmp9 (**f, h, j**). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$). 48

Figura 38. Expressão gênica de genes relacionados à diferenciação celular: Runx2 (**a**), Alp (**b**), Bsp (**c**), Spp1 (**d**), Bglap2 (**e**) e Dmp1 (**f**) em contato indireto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. ** ($p < 0,01$) *** e **** ($p < 0,0001$). 49

Figura 39. Ensaio de adesão celular por Cristal Violeta (**a**), ensaio de viabilidade celular por MTT (**b**) e expressão gênica de genes relacionados à adesão celular: Fak (**c**) e Src (**d**), utilizando a tecnologia q-PCR. Os testes foram realizados em contato direto com as diferentes superfícies pelo período de 24 horas. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,0001$). 51

Figura 40. Expressão gênica de genes envolvidos no ciclo celular: P15 (**a**), Cdk2 (**b**), Cdk4 (**c**) e Cdk6 (**d**), em contato direto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados

representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. ** (p<0,01) e **** (p<0,0001). 53

Figura 41. Expressão gênica de genes envolvidos no rearranjo da matriz extracelular: Timp1 **(a)**, Timp2 **(b)**, Mmp2 **(c)** e Mmp9 **(d)**, em contato direto, utilizando a tecnologia q-PCR. As análises para a atividade enzimática das MMPs foram realizadas utilizando a técnica de Zimografia. Degradações da gelatina demonstrada por SDS-PAGE revelaram a faixa de atividade relativa para as gelatinases **(e)**, além das análises estatísticas para as atividades de Mmp2 **(f, h, j)** e Mmp9 **(g, i, k)**. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * (p<0,05), ** (p<0,005), *** (p<0,0004) e **** (p<0,0001)..... 55

Figura 42. Ensaio de adesão celular por Cristal Violeta **(a)**, ensaio de viabilidade celular por MTT **(b)** e expressão gênica de genes relacionados à adesão celular: Fak **(c)** e Src **(d)**, utilizando a tecnologia q-PCR. Os testes foram realizados em contato indireto com as diferentes superfícies pelo período de 24 horas. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. **** (p<0,0001). 57

Figura 43. Expressão gênica de genes envolvidos no ciclo celular: P15 **(a)**, Cdk2 **(b)**, Cdk4 **(c)** e Cdk6 **(d)**, em contato indireto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * (p<0,04), ** (p<0,009) e **** (p<0,0001). 58

Figura 44. Expressão gênica de genes envolvidos no rearranjo da matriz extracelular: Timp1 **(a)**, Timp2 **(b)**, Mmp2 **(c)** e Mmp9 **(d)**, em contato indireto, utilizando a tecnologia q-PCR. As análises para a atividade enzimática das MMPs foram realizadas utilizando a técnica de Zimografia. Degradações da gelatina demonstrada por SDS-PAGE revelaram a faixa de atividade relativa para as gelatinases **(e)**, além das análises estatísticas para a atividade de Mmp2 **(f)** e Mmp9 **(g)**. Os resultados representam a

média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,006$), *** ($p < 0,0006$) e **** ($p < 0,0001$)..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers e detalhes técnicos desenvolvidos nos ensaios de qPCR para os diferentes genes estudados em contato com pré-osteoblastos..... 19

Tabela 2. Sequência de primers e detalhes técnicos desenvolvidos nos ensaios de qPCR para os diferentes genes estudados em contato com fibroblastos..... 19

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

α -MEM: Meio mínimo essencial com modificação alfa

ALN: Sigla representante do Alendronato de Sódio

ALP: Fosfatase Alcalina

ANOVA: Análise de Variância

BGLAP2: Osteocalcina

BSA: Proteína Albumina de Soro Bovino

BSP: Sialoproteína Óssea

CaCl₂: Cloreto de Cálcio

CDK: Quinase Dependente de Ciclina

cDNA: DNA complementar

CO₂: Dióxido de Carbono

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMP1: Proteína da Matriz Dentinária 1

DRX: Difração de raios x

FAK: Quinase de Adesão Focal

FBS: Soro Fetal Bovino

GAPDH: Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

Itg β 1: Integrina- β 1

kDa: KiloDalton

mA: Miliampère

MEC: Matriz Extracelular

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MMP: Metaloproteinases de Matriz Extracelular

mRNA: RNA mensageiro

MTT: Ensaio de viabilidade celular

Ni: Níquel

P15: Proteína envolvida com repressão do ciclo celular

PBS: Solução salina tamponada com Fosfato

PP2A: Proteína Fosfatase 2

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Ra: Rugosidade superficial aritmética

RNA: Ácido ribonucleico

RPM: Rotação por minuto

RUNX2: Fator de transcrição relacionado ao RUNT2

SPP1: Osteopontina

SRC: Tirosina Quinase

Ti Cp4: Titânio comercialmente puro grau IV

TIMP: Inibidor Tecidual de Metaloproteinases

TiO₂: Dióxido de Titânio

x g: Força de rotação medida em “g”

XPS: Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios-x

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biomateriais e implantes	1
1.2 Titânio (Ti)	2
1.3 Dióxido de Titânio (TiO ₂)	2
1.4 Funcionalização do titânio	4
1.5 Albumina	6
1.6 Bisfosfonatos (BPs)	8
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Preparo dos substratos	12
3.2 Síntese da solução de TiO ₂	12
3.3 Deposição do filme de TiO ₂	13
3.4 Funcionalização	13
A. Técnicas de caracterização de superfície	14
3.5 Difração de Raios x (DRX)	14
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	14
3.7 Microscopia Óptica Confocal	14
3.8 Ângulo de Contato e Energia de Superfície	15
3.9 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios x (XPS)	15
B. Técnicas de análise do comportamento celular	15
3.10 Cultivo celular	15
3.11 Desenho experimental	16
3.12 Redução do MTT	17
3.13 Cristal Violeta	18

3.14	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	18
3.15	Microscopia Óptica Confocal de Fluorescência	19
3.16	Zimografia	20
3.17	Análise estatística	20
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
4.1	Difração de Raios x (DRX)	21
4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	21
4.3	Microscopia Óptica Confocal.....	22
4.4	Ângulo de Contato e Energia de Superfície	25
4.5	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios x (XPS).....	26
4.6	Modelos possíveis para a fixação das moléculas.....	34
4.7	Testes biológicos com pré-osteoblastos (MC3T3)	36
4.7.1	Testes em contato direto com as superfícies.....	36
4.7.2	Testes em contato indireto com as superfícies.....	43
4.8	Testes biológicos com fibroblastos (3T3)	50
4.8.1	Testes em contato direto com as superfícies.....	50
4.8.2	Testes em contato indireto com as superfícies.....	56
5.	CONCLUSÕES	60
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biomateriais e implantes

Apesar do termo “biomaterial” ter surgido nos anos de 1900, há relatos na literatura de que o seu uso teve início pelas civilizações egípcias (2000 a.C.) com a utilização de suturas. Os maias (600 a.C.) foram os pioneiros na criação de dentes artificiais de conchas e, em seguida, os franceses (200 a.C.) com a fabricação de dentes de ferro (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; AMATO; EZZELL, 2014). Durante muitas décadas, os dispositivos foram aperfeiçoados aos poucos, assim como as suas aplicações e definições. Em 2009, Williams definiu um biomaterial como “uma substância que foi projetada para assumir uma forma que, isoladamente ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, em medicina humana ou veterinária” (WILLIAMS, 2009).

O aumento na expectativa de vida juntamente com o acréscimo da população mundial ocasionou uma maior aplicação dos biomateriais, principalmente na área de implantodontia (ABDEL-HADY GEPREEL; NIINOMI, 2013). Esse aumento é significativo no Brasil, pois cerca de 800 mil implantes e 2,4 milhões de componentes de próteses dentárias são colocados por ano no país (ABIMO, 2019). Nos Estados Unidos, aproximadamente 300 mil pacientes possuem implantes dentários (GUGLIELMOTTI; OLMEDO; CABRINI, 2019). Além do crescimento no número de cirurgias de substituições, as cirurgias de revisões também aumentaram consideravelmente, e isso está relacionado diretamente ao índice de falhas de implantes, o que afeta a osseointegração e atrasa os processos regenerativos (ABDEL-HADY GEPREEL; NIINOMI, 2013; ALVES et al., 2015; KANG et al., 2019; OH; SHIAU; REYNOLDS, 2019).

Para reduzir o número de falhas e aumentar a resposta positiva do corpo ao entrar em contato com um biomaterial, muitos estudos de modificações de superfícies têm sido realizados principalmente em implantes, pois os dispositivos utilizados devem atender alguns pré-requisitos, tais como biocompatibilidade, que é a apropriada comunicação entre as células e tecidos do organismo e o biomaterial; boas propriedades mecânicas, resistência à corrosão e ao desgaste, elevada ductilidade, ser esterilizável, entre outras características importantes (GEETHA et al., 2009; WILLIAMS, 2014).

Existem diversas matérias-primas acessíveis para o processamento de biomateriais, sendo a classe dos metais utilizada desde 1900 por sustentar estresses mecânicos e outras

propriedades que auxiliam no reparo ósseo. Os biomateriais metálicos apresentam diversas aplicações, incluindo implantes, próteses, parafusos, placas, fios e instrumentos cirúrgicos. Os metais comumente utilizados incluem os aços inoxidáveis, ligas à base de cromo-cobalto, o titânio puro e suas ligas, sendo o titânio o metal mais utilizado atualmente pela indústria geral (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; EDDY JAI POINERN; BRUNDAVANAM; FAWCETT, 2013).

1.2 Titânio (Ti)

O titânio é atualmente um dos metais com utilização mais ampla e diversificada da indústria. Esse metal foi descoberto pelo mineralogista britânico William Justin Gregor no final do século XVIII, mas sua produção em escala industrial somente se deu início em 1948. Entretanto, inúmeras áreas foram beneficiadas com a descoberta desse metal, como a indústria química, petroquímica, naval, aeroespacial, automobilística, construção civil, dentre outras (LÜTJERING; WILLIAMS, 2007). Em 1960 o titânio começou a ser utilizado no Reino Unido e nos Estados Unidos em implantes. Desde então, a grande maioria dos implantes ortopédicos e dentários é constituída de titânio comercialmente puro (Ti-Cp) e suas ligas, sendo o titânio considerado atualmente o padrão ouro, devido a uma combinação favorável de particularidades como adequada biocompatibilidade e sua capacidade de facilitar a osseointegração, elevada resistência à corrosão e êxito clínico superior a outros metais (KOIZUMI et al., 2019). Algumas dessas características relevantes do titânio se devem ao grande avanço nos estudos de modificação de superfícies (RUPP et al., 2018).

O titânio é capaz de apresentar duas formas distintas de arranjo cristalino e tal propriedade varia conforme a temperatura. A estrutura hexagonal compacta (HC, fase α) é constante desde temperatura ambiente até 882 °C, e a partir desta temperatura, ocorre uma mudança na estrutura, a estrutura cúbica de corpo centrado (CCC, fase β). O desenvolvimento de ligas de titânio tem crescido nos últimos anos por apresentar boa usinagem e baixo módulo de elasticidade, e alguns elementos podem constituir essas ligas como o alumínio (Al), ferro (Fe), níquel (Ni), vanádio (V) e outros elementos que não apresentem respostas citotóxicas ao organismo (KOIZUMI et al., 2019; CORDEIRO; BARÃO, 2017).

1.3 Dióxido de Titânio (TiO₂)

O TiO₂ pertence a família dos óxidos de metais de transição. Sua produção se estabeleceu no início do século XX visando a substituição de óxidos de chumbo tóxicos

(CARP; HUISMAN; RELLER, 2004). O TiO_2 apresenta três fases cristalográficas principais, conhecidas como anatase (tetragonal), brookita (ortorrômbica) e rutilo (tetragonal) (NAM; HYUN; BOO, 2012). Todas estas fases encontram-se na natureza, porém, a fase rutilo apresenta maior estabilidade termodinâmica (ALEMANY et al., 2000; HENGZHONG; BANFIELD, 2000). Estas estruturas estão organizadas em cadeias de octaedros de TiO_6 . A fase anatase é composta por quatro unidades de TiO_2 , onde cada átomo de oxigênio é ligado a três átomos de Ti, como mostrado na **Figura 1a**. A fase rutilo apresenta duas unidades de TiO_2 , onde cada átomo de Ti é envolto por seis átomos de oxigênio (**Figura 1b**) (BOURIKAS; KORDULIS; LYCOURGHOTIS, 2014). A fase brookita tem uma estrutura que difere da anatase e rutilo, esta é constituída por oito átomos por célula unitária (**Figura 2**) (MO; CHING, 1995).

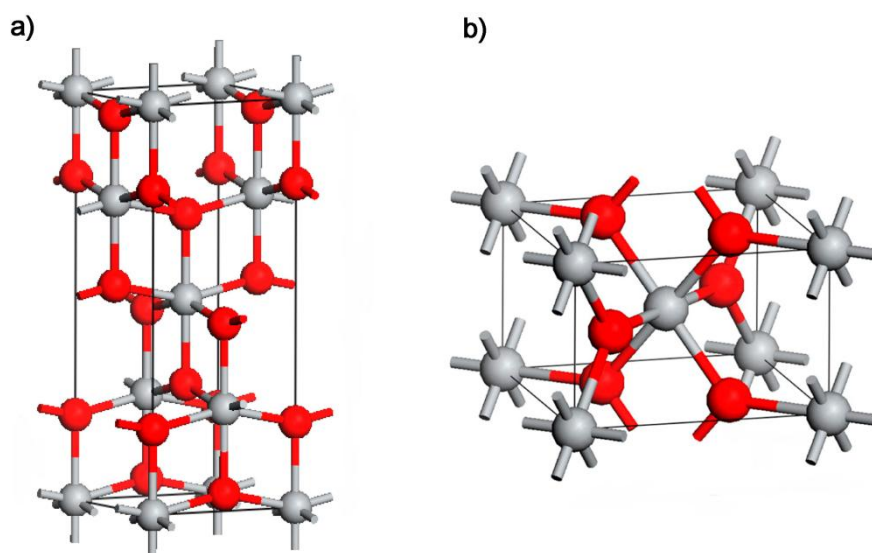


Figura 1. Disposição tetragonal das fases anatase (a) e rutilo (b). Os átomos de Ti estão representados pelas esferas cinzas e os átomos de oxigênio pelas esferas vermelhas. Fonte: adaptado de BOURIKAS; KORDULIS; LYCOURGHOTIS, 2014.

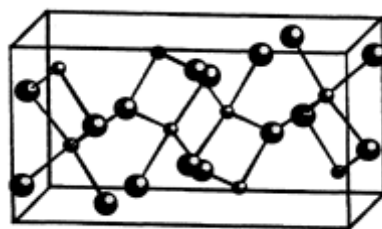


Figura 2. Disposição ortorrômbica da fase brookita. Fonte: MO; CHING, 1995.

O titânio comercialmente puro e suas ligas apresentam as propriedades aceitáveis para um implante, sendo que tal desempenho está também associado à formação da camada amorfa de óxido (TiO_2) que se forma de modo espontâneo, com espessura de 2 a 6 nm, prevenindo a corrosão do metal. Após a implantação do titânio, este sofre processos de tribocorrosão, podendo levar à perda desta camada delgada e irregular de óxido, expondo a superfície do titânio metálico ao ambiente biológico e causando a degradação do mesmo. Para melhorar a biocompatibilidade, a resistência à corrosão e, conseqüentemente, o tempo de vida do implante, a deposição de um filme fino de TiO_2 cristalino mais homogêneo e espesso tem sido pesquisada (YETIM, 2010; SILVA-BERMUDEZ; RODIL, 2013). Estudos apontam que a camada nativa de óxido era menos biocompatível do que uma camada mais espessa de TiO_2 (WERNER; MAITZ; SPERLING, 2007).

Vários métodos são utilizados para a preparação do filme fino de TiO_2 , como *RF sputtering*, deposição de vapor químico, evaporação por feixe de elétrons, síntese química de um composto por método sol-gel, entre outros. O sol-gel começou a ser utilizado por volta de 1900 e desde então é muito utilizado pela comunidade científica em razão das inúmeras vantagens, como baixo custo, adequada homogeneidade, controle da estrutura do filme, boa reprodutibilidade, estabilidade, revestimento de grandes áreas e baixa temperatura de processamento (KHAN et al., 2017; KAJITVICHYANUKUL; ANANPATTARACHAI; PONGPOM, 2005). Neste método, a solução ou sol modifica-se em gel através das ligações químicas entre as partículas obtendo uma rede sólida tridimensional (HIRATSUKA; SANTILLI; PULCINELLI, 1995).

1.4 Funcionalização do titânio

As diferentes técnicas de modificação e funcionalização de superfícies são atualmente reconhecidas como fatores cruciais para aprimorar a performance de implantes quando em contato com o corpo humano. A deposição de uma camada cristalina de óxido na superfície

do metal é realizada com diversas finalidades, e uma delas é melhorar a resistência à corrosão e evitar a liberação de íons metálicos e partículas tóxicas ao organismo provenientes do metal, podendo levar ao afrouxamento do implante médico (ASRI et al., 2017; MACDONALD; RAPUANO; SCHNIEPP, 2011).

A superfície do TiO_2 quando em contato com o meio aquoso reage imediatamente com as moléculas de água presentes, e, assim, ocorre a formação espontânea de grupos hidroxilas ($-\text{OH}$) na superfície (HANAWA, 2011). A relevância das relações entre a adsorção de proteínas e células na biocompatibilidade de superfícies de implantes tem sido estudada recentemente, assim como a acentuada interação dos grupos $-\text{OH}$ com as funções biológicas das superfícies, pois estas favorecem um sítio adequado para rápida interação com as proteínas dos fluidos biológicos (WANG et al., 2018). O aumento dos grupos hidroxílicos na superfície somente é possível com o tratamento físico-químico, e a concentração de hidroxilas está diretamente relacionada à adesão de células ósseas, como os osteoblastos (FENG et al., 2003).

A interação do óxido com o ambiente e a formação de grupos hidroxílicos na superfície ocorre espontaneamente, conforme mostrado na **Figura 3a**, e em seguida inicia-se a ligação espontânea de espécies inorgânicas (cálcio, magnésio, sódio, potássio) (**Figura 3b**) presentes no plasma sanguíneo. Com a ligação de biomoléculas (proteínas, glicoproteínas, glicolipídios, lipoproteínas, polissacarídeos) na superfície do biomaterial, iniciam-se as cascatas de sinalizações celulares (**Figura 3c**) que levam a adesão. No entanto, a interação proteica no titânio muitas vezes é variável, pois algumas proteínas se aderem de modo irreversível no metal e outras apresentam uma ligação fraca, podendo ocasionar a dessorção após um longo período de tempo (BRUNETTE et al., 2001).

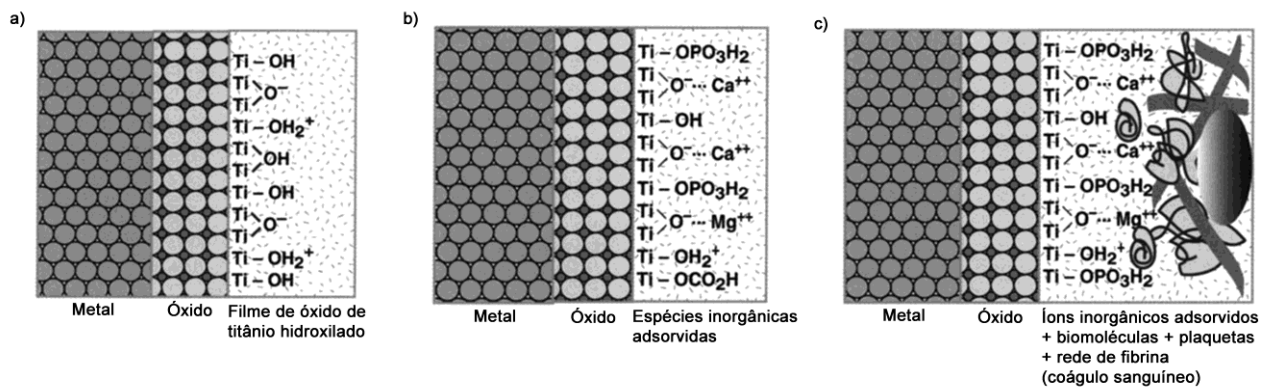


Figura 3. Estágios iniciais das comunicações bioquímicas que sucedem a exposição da superfície do óxido ao ambiente biológico. Hidroxilação e hidratação do óxido de titânio **(a)**. Adsorção de cátions e ânions constituintes do fluido corporal, principalmente cálcio e fosfato **(b)**. Adsorção de biomoléculas, fixação de plaquetas e formação de rede de fibrina em contato com o sangue **(c)**. Fonte: adaptado de BRUNETTE et al., 2001.

Além da deposição do óxido cristalino no titânio metálico, a funcionalização deste óxido também pode ser utilizada para modificar quimicamente a superfície, sendo tal estratégia um fator determinante na adsorção de proteínas (WANG et al., 2018). A imobilização de biomoléculas como proteínas na superfície de óxidos, a partir de ligações hidrofílicas, hidrofóbicas e interações eletrostáticas, tem se mostrado uma alternativa favorável para acelerar os processos envolvidos na adesão, proliferação e migração de células, bem como a posterior deposição de mineral (KOPAC; BOZGEYIK, 2010; BRONZE-UHLE et al., 2019b).

1.5 Albumina

O plasma sanguíneo humano tem em sua constituição diversos tipos de diferentes substâncias e proteínas (albumina, fibrinogênio, fibronectina), no entanto, a albumina, que apresenta uma estrutura globular, merece atenção pela sua abundância e versatilidade (KAWASHITA et al., 2014). A albumina representa aproximadamente 60% do total de proteínas globulares do soro e sua principal atuação no sangue é transportar inúmeros compostos, além de controlar a pressão osmótica e o valor de pH sanguíneo (JAHANBAN-ESFAHLAN; PANAHI-AZAR; SAJEDI, 2016; XU et al., 2012).

A HSA (Albumina de Soro Humana) apresenta peso molecular de 66,8 kDa e sua organização estrutural possui 586 aminoácidos dispostos em três domínios homólogos (I, II e III), sendo que esses domínios apresentam dois subdomínios denominados A e B (JAHANBAN-ESFAHLAN et al., 2019). Essa disposição é demonstrada na **Figura 4**.

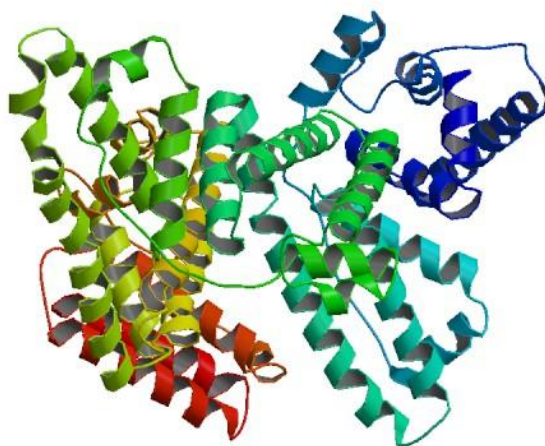


Figura 4. Estrutura tridimensional da HSA com seus domínios homólogos. Fonte: PDB id 1AO6.

A BSA (Albumina de Soro Bovino) apresenta propriedades estruturais semelhantes à da HSA. Sua estrutura é formada por uma cadeia de polipeptídeos de 583 aminoácidos e três domínios, e o seu peso molecular é de aproximadamente 66,5 kDa (JAHANBAN-ESFAHLAN et al., 2019). Essa proteína apresenta diversas interações com outros agentes e sua conformação pode sofrer modificações significativas frente a alterações de valores de pH e temperatura. A transformação da forma N para a F requer a abertura da molécula e pH na faixa de 4,3, e a transição da forma F para a E confere a extensão da proteína, com pH em torno de 2,7 (**Figura 5**) (CARTER; HO, 1994). A BSA é uma proteína muito estudada e possui algumas funções na área médica, além de ser utilizada como proteína padrão em ensaios bioquímicos, e essas aplicações devem-se a algumas propriedades, como a sua forte semelhança estrutural com a HSA (cerca de 76%), pelo seu baixo custo, acessibilidade, estabilidade e outras características (XU et al., 2012; JAHANBAN-ESFAHLAN et al., 2019). Essas particularidades justificam a imobilização da BSA em superfícies implantáveis de dispositivos. A adsorção de proteínas é a primeira etapa da osteocondução, que antecede o recrutamento de células específicas, que formam um filme na superfície do metal para evitar a corrosão. Este mecanismo pode ser facilitado com a deposição de BSA na superfície a ser implantada. Há relatos na literatura que sugerem que esta proteína maximiza os processos de adesão e proliferação de osteoblastos (HAYASHI et al., 2012).

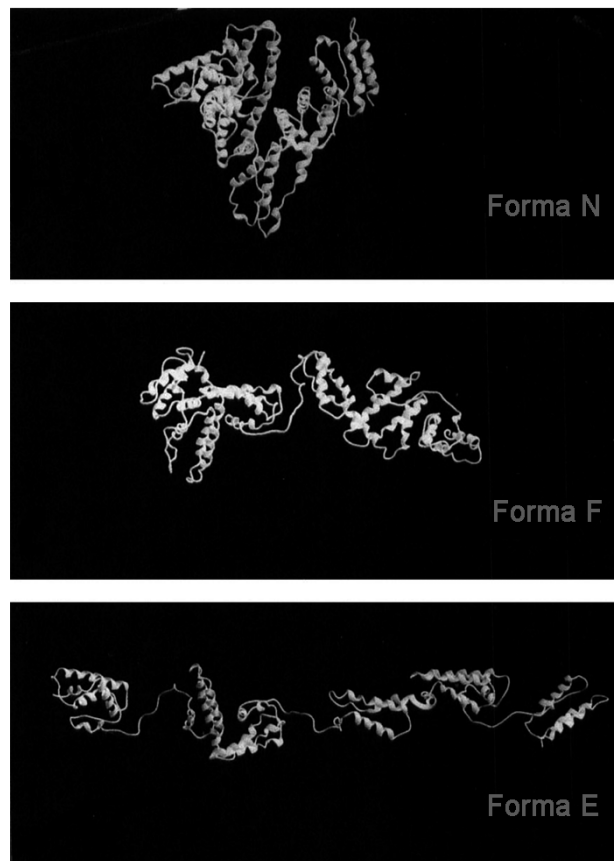


Figura 5. Diferentes estruturas conformacionais da BSA (formas N, F e E). Fonte: adaptado de CARTER; HO, 1994.

1.6 Bisfosfonatos (BPs)

Os bisfosfonatos são substâncias análogas do pirofosfato (PPi), conhecido pela sua função natural de inibir a reabsorção óssea (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005). A estrutura química, a afinidade com a hidroxiapatita, a inibição da atividade dos osteoclastos modulando a resposta óssea são características de ambos compostos (MENDES et al., 2019; ABTAHI; TENGVALL; ASPENBERG, 2010). São substâncias descobertas no século XIX e têm sido utilizadas desde então na indústria como agentes anticorrosivos devido às suas propriedades físico-químicas (WATTS; DIAB, 2010). Como fármacos apresentam inúmeras aplicações na área clínica desde a década de 1960, quando o uso oral e endovenoso de alguns desses compostos começaram a ser aprovadas nos Estados Unidos (CAIRES et al., 2017). Atualmente representam a terapia de primeira linha utilizada no tratamento de doenças como a osteoporose, doença de Paget, hipercalcemia maligna e outras (ABTAHI; TENGVALL; ASPENBERG, 2010). Com o aumento da expectativa de vida populacional, o interesse no

tratamento de doenças ósseas tem crescido nos últimos anos, assim como o uso desses fármacos (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005).

Os bisfosfonatos estão disponíveis sob duas formas:

- Com nitrogênio em sua composição (risedronato, alendronato, zolendronato, ibandronato, pamidronato).
- Sem nitrogênio em sua composição (tiludronato e etidronato) (IZQUIERDO; OLIVEIRA; WEBER, 2011).

Sua estrutura é formada por ligações P–C–P que é responsável pela forte afinidade com o mineral ósseo (**Figura 6**), onde distintos substituintes (R_1 e R_2) ligam-se ao carbono central e determinam a estrutura específica de cada fármaco (FARRELL et al., 2018). A estrutura dos bisfosfonatos difere do pirofosfato (P–O–P), onde o átomo de oxigênio é substituído pelo de carbono. Essa modificação na estrutura ocasiona maior resistência à degradação enzimática dessas moléculas.

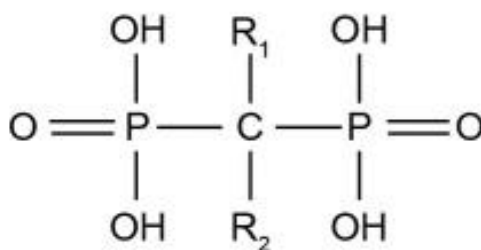


Figura 6. Estrutura química geral dos bisfosfonatos. Fonte: adaptado de FARRELL et al., 2018.

Por possuírem alta compatibilidade com o mineral ósseo, a quantidade de fármaco disponível na corrente sanguínea, acumula-se nos locais de reabsorção óssea dos osteoclastos. A **Figura 7** exemplifica os efeitos da ação desse fármaco nestas células. Esse fármaco quando em contato com os osteoclastos podem levar a apoptose, e com isso aumentar significativamente a atividade de osteoblastos (ABTAHI; TENGVALL; ASPENBERG, 2010), além de alterar o rearranjo do citoesqueleto e ocasionar alterações sutis nestas células que afetam a atividade de reabsorção. Além de apresentar efeitos na atividade osteoclástica, esses compostos também afetam enzimas e vias metabólicas que utilizam pirofosfato, e isto se deve a semelhança estrutural que esses compostos compartilham (ROGERS et al., 2000).

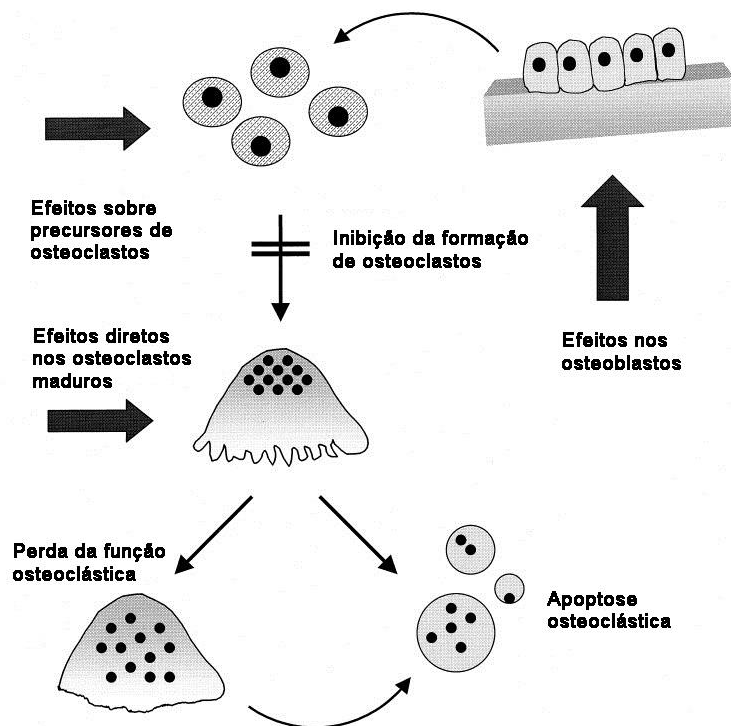


Figura 7. Rotas pelas quais os bisfosfonatos podem inibir a atividade de osteoclastos durante reabsorção óssea. Fonte: adaptado de (ROGERS et al., 2000).

A funcionalização de superfícies de implantes de titânio com bisfosfonatos como o alendronato de sódio visando uma melhora na fixação mecânica, diminuição no índice de falhas e adequada osseointegração tem sido pesquisada (GUIMARÃES et al., 2017). Diversos estudos na literatura confirmam a boa interface entre a superfície do implante e osso ocasionada pela ação desses fármacos, no entanto, uma investigação da ação de bisfosfonatos imobilizados nas superfícies de TiO_2 torna-se interessante na área de implantodontia (BRONZE-UHLE et al., 2019a). Neste contexto, o presente estudo trabalha a temática de biofuncionalização da superfície de titânio buscando uma compreensão acerca de mecanismos celulares e moleculares envolvidos com a interação de células.

1. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Modificar superfícies a base de titânio multifuncional para implantes osseointegrativos, adquirindo superfícies biologicamente seletivas que promovam apropriada adesão e proliferação de células ósseas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Depositar filmes finos de TiO_2 na fase rutilo sob a superfície de substratos de titânio metálico grau IV, utilizando a técnica de *spin-coating* e posterior caracterização do mesmo.
2. Funcionalizar as superfícies de TiO_2 com alendronato de sódio e a proteína albumina de soro bovino (BSA).
3. Definir a atuação de biomoléculas a partir da avaliação da química da superfície, molhabilidade, rugosidade e topografia superficiais.
4. Avaliar a resposta biológica referente ao filme de TiO_2 funcionalizado com alendronato e BSA a partir de testes de citotoxicidade direta e indireta *in vitro* e análise da adesão, crescimento e proliferação celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo dos substratos

Neste trabalho, discos de titânio comercialmente puro grau IV (Acnis do Brasil) com especificamente 12,7 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram utilizados como substratos. Com a finalidade de se obter uniformidade e retirar a camada de óxido natural nas superfícies, estes foram polidos em uma politriz (Arotec Aropol-2V) utilizando lixas d'água de granulometria 320, 400, 600 e 800. Posteriormente, os discos foram lavados em um ultrassom (UNIQUE – USC-700) durante 30 minutos, sendo que, destes, 10 minutos ficaram submersos em água deionizada, 10 minutos em álcool isopropílico e 10 minutos em água deionizada, respectivamente. Este processo tem o objetivo de retirar impurezas provenientes da lixa no substrato. Após a descontaminação das superfícies das amostras, estas foram limpas com uma solução Piranha (mistura de 7:3 (v/v) 98% H_2SO_4 e 30% H_2O_2) durante 2 horas e, em seguida, estas foram novamente lavadas em água deionizada no ultrassom para posterior deposição do óxido. A **Figura 8** mostra as etapas do preparo das amostras metálicas.

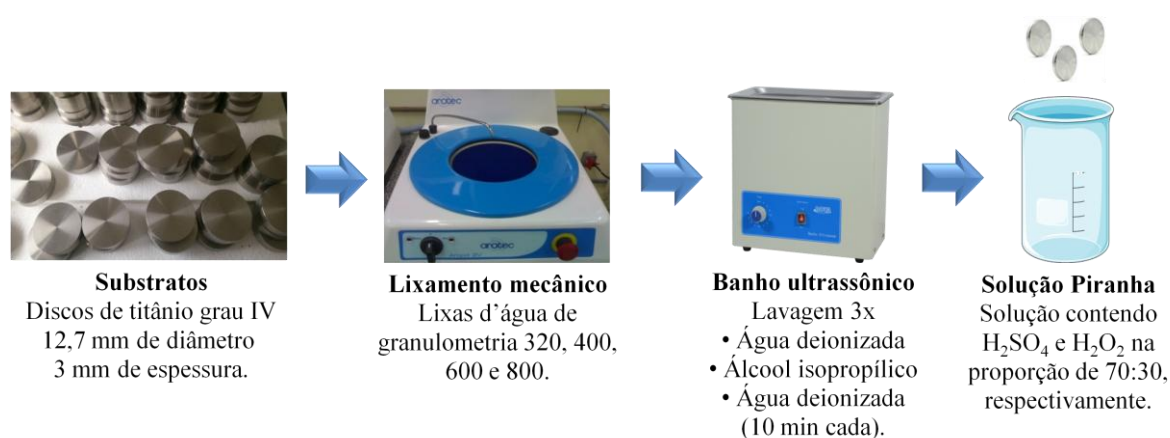


Figura 8. Diferentes etapas do preparo dos substratos metálicos. Fonte: produzido pelo autor.

3.2 Síntese da solução de TiO_2

A solução de TiO_2 foi sintetizada utilizando o método sol-gel (TRINO et al., 2018). Foi adicionada água destilada (185 ml) em um béquer, isopropanol (56,7 mL, Merck, 99,5%) e ácido nítrico (2,6 mL, Synth, 65%), respectivamente. Posteriormente, foi acrescentado isopropóxido de titânio grau IV (15 mL, Aldrich, 99,99%) e esta mistura foi mantida sob agitação durante 30 minutos. Em seguida, iniciou-se a etapa de peptização aquecendo a

solução até 85 °C e mantendo a agitação por 4 horas. A vaporização dos solventes durante a hidrólise tem como consequência a condensação do colóide, que mostra uma coloração azulada. Para a formação da fase de gel, a solução foi mantida sob aquecimento e agitação até que a solução exibisse coloração branca. Finalmente, foi adicionado o surfactante Triton X-100 (0,816 g, Synt) em 50 mL da solução, permanecendo sob agitação por 15 minutos.

3.3 Deposição do filme de TiO₂

O filme de TiO₂ foi depositado utilizando um *spin-coater* (PWM32-PS-R790, Headway Research INC). Três gotas da solução foram depositadas na superfície de cada substrato e o espalhamento ocorreu por 60 segundos a 2000 RPM. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma chapa aquecedora a 40 °C durante 1 minuto. Este procedimento foi repetido por três vezes para cada amostra. Posteriormente, as amostras revestidas com TiO₂ foram colocadas em uma mufla a 850 °C onde permaneceram por 2 horas numa taxa de aquecimento de 1 °C/min (TRINO et al., 2018). A **Figura 9** enfatiza a deposição da solução de TiO₂ nas superfícies dos discos.



Figura 9. Processo de deposição do filme de TiO₂ nas superfícies. Fonte: produzido pelo autor.

3.4 Funcionalização

A superfície de TiO₂ foi funcionalizada com alendronato de sódio e proteína albumina de soro bovino (BSA), pelo método de imersão conforme descrito a seguir:

Alendronato de Sódio: Uma solução contendo metanol e água deionizada na proporção de 60:40, respectivamente. O Alendronato de Sódio (Sigma Aldrich, 99,99%) foi adicionado na concentração de 0,5 mg/mL a esta mistura. Os substratos permaneceram imersos por 12 horas, mantendo-se o controle de três amostras imersas em 5,0 mL da solução. Por fim, as amostras foram lavadas com água deionizada e aquecidas na mufla a 100 °C por 2 horas (ZHENG; NEOH; KANG, 2017).

Albumina de Soro Bovino (BSA): Preparou-se uma solução na concentração de 0,4 mg de BSA (Sigma Aldrich, 96%) por mL de PBS 1x (Sigma Aldrich). Foi realizado um controle do volume de solução utilizada com relação ao número de amostras imersas para imobilização, utilizando-se 30 mL da solução para três amostras. Os substratos permaneceram imersos por 6 horas e, em seguida, foram lavados com PBS e posteriormente com água deionizada (MARTINS; RATNER; BARBOSA, 2003) (GOMES et al., 2020).

A. Técnicas de caracterização de superfície

3.5 Difração de Raios x (DRX)

O difratograma das amostras em estudo foi obtido em temperatura ambiente em um difratômetro da marca Rigaku, modelo MiniFlex600, da Unesp/Bauru, com radiação CuK_α ($\lambda=0,154056$ nm) e filtro de Ni para eliminação da radiação K_β . Foram utilizadas fendas DS 1,25°, SS 1,25° e RS 0,3 mm com corrente de 15 mA e um potencial de 40 kV. Para determinar a estrutura cristalina das amostras, os resultados foram comparados com o padrão PCPDF 76–1949.

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização estrutural dos filmes foi realizada por microscopia eletrônica de varredura da marca Zeis, modelo LS15, do Laboratório Multiusuários da Unesp/Bauru. As amostras foram revestidas com ouro e coladas com uma fita dupla face sobre o porta amostra (stub) para a realização das medidas e obtenção das imagens.

3.7 Microscopia Óptica Confocal

A caracterização da rugosidade superficial das amostras foi realizada utilizando um microscópio confocal da marca Leica, modelo DCM 3D, do Laboratório de Materiais Avançados e Nanotecnologia da Unesp/Bauru. As medidas foram realizadas com um aumento de 200x (área igual a 636,61 x 477,25 mm²). Os valores aritméticos da rugosidade superficial

(Ra) foram determinados calculando-se os valores médios de três áreas selecionadas aleatoriamente de cada amostra.

3.8 Ângulo de Contato e Energia de Superfície

As medidas de ângulo de contato e energia de superfície foram realizadas em um goniômetro (Ramé–Hart 100-00, Succasunna, NJ, EUA) do Laboratório de Plasmas Tecnológicos da Unesp/Sorocaba utilizando a técnica de gota sésil. Água deionizada (substância polar) e diiodometano (substância apolar) foram utilizados como líquidos de sondagem. Um programa de processamento de imagens determinou o perfil de queda dos dois líquidos calculando o ângulo de contato e a energia da superfície. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente e três pontos foram analisados para melhores estatísticas para cada amostra.

3.9 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios x (XPS)

As composições químicas das superfícies foram analisadas utilizando um espectrômetro Scienta Omicron ESCA, equipado com um analisador EA125 e um monocromador XM 1000, utilizando uma fonte de raios x Al K α (1486,7 eV), do Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF/CEPID/FAPESP) em São Carlos. O ajuste da curva foi realizado usando o software CasaXPS no modo de linha GL (30) e uma constrição FWHM entre 0,7 e 2,5 eV. A identificação do pico foi realizada para obter um ajuste consistente para todos os potenciais investigados.

B. Técnicas de análise do comportamento celular

3.10 Cultivo celular

Neste estudo foram utilizados pré-osteoblastos (MC3T3-E1, subclone 4) e fibroblastos (NIH3T3) de camundongos. Os pré-osteoblastos foram cultivados em α -MEM (Meio Mínimo Essencial com modificação Alfa), e os fibroblastos foram cultivados em RPMI-1640, ambos suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) (Nutricell), mantidos a 37 °C e à atmosfera de 5% de CO₂. Passagens semiconfluentes foram tripsinizadas e usadas em todos os experimentos deste estudo.

3.11 Desenho experimental

Os experimentos foram realizados com as células em contato direto e indireto com as superfícies no período de 24 horas, de acordo com a norma ISO 10993:2016. A **Figura 10** mostra a metodologia experimental das células em contato direto com as superfícies, e a **Figura 11** enfatiza as células em contato indireto.

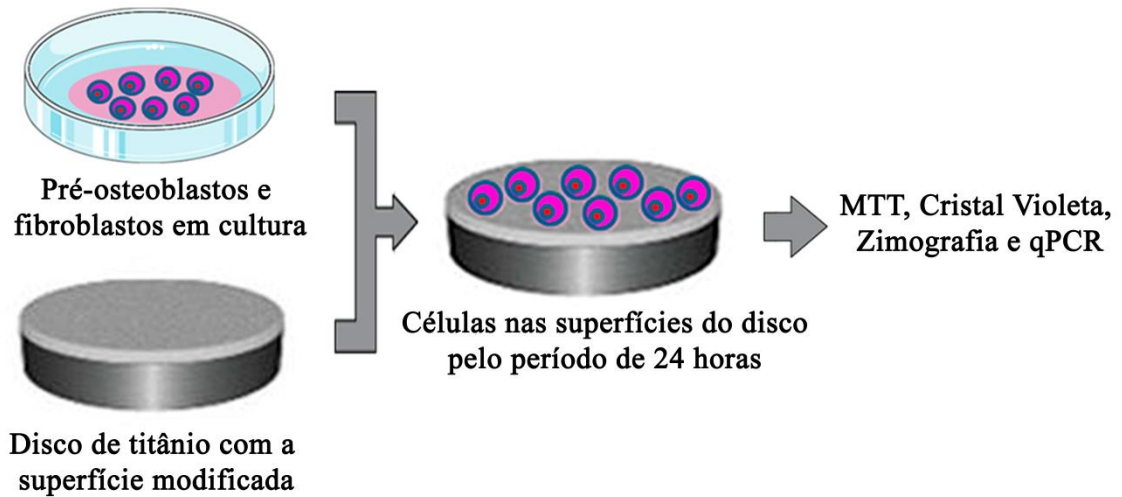


Figura 10. Design da metodologia experimental do contato direto. Os pré-osteoblastos e fibroblastos foram depositados nas superfícies modificadas dos discos por 24 horas e, em seguida, as amostras foram coletadas para as análises. Fonte: produzido pelo autor.

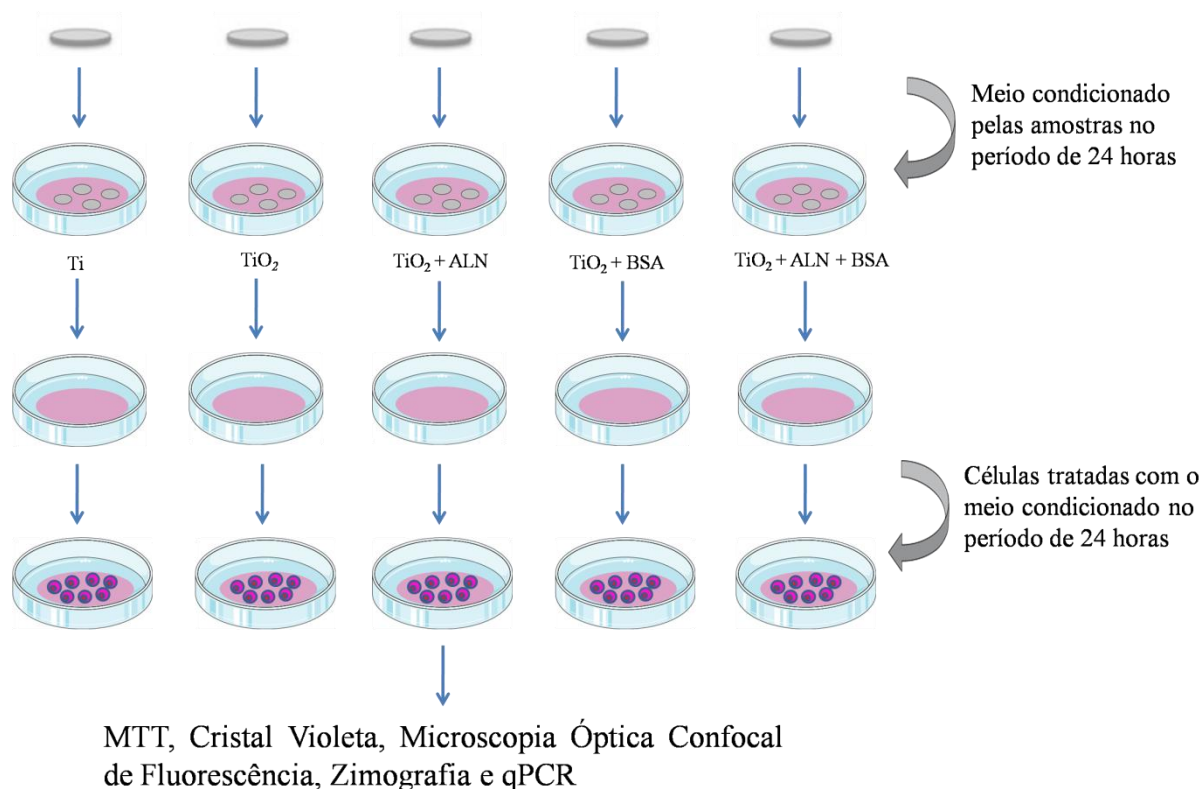


Figura 11. Design da metodologia experimental do contato indireto. Os discos de titânio com suas superfícies modificadas foram incubados em meio de cultura RPMI isento de Soro Fetal Bovino por 24 horas. O meio condicionado pelas amostras foi utilizado para o tratamento de pré-osteoblastos e fibroblastos por 24 horas e, em seguida, as amostras foram coletadas para as análises. Fonte: produzido pelo autor.

3.12 Redução do MTT

Contato direto: as células foram semeadas (1×10^4 células/mL) por 24 horas sobre os discos que foram colocados em placas de 12 poços. Após esse período, as amostras foram transferidas para outra placa e o corante de MTT (1,0 mg/mL) foi adicionado e manteve-se as amostras por mais 3 horas na estufa.

Contato indireto: as células foram semeadas (1×10^4 células/mL) por 24 horas com o meio condicionado pelas superfícies. Em seguida, o meio condicionado foi transferido para outra placa e o corante de MTT (1,0 mg/mL) foi adicionado e manteve-se as amostras por mais 3 horas na estufa.

Posteriormente, o meio contendo MTT foi removido e 1,0 mL de etanol absoluto foi adicionado para solubilização do corante azul formado por células viáveis. Após a solubilização, o meio foi transferido para uma placa de 96 poços, 3 por experimento ($n=9$), para que a viabilidade fosse avaliada pelo método de MTT. Depois, os valores de absorbância

foram medidos a 570 nm usando um leitor de microplaca (leitor multi-modo SYNERGY-HTX, Biotek, EUA) (MOSMANN, 1983).

3.13 Cristal Violeta

As células aderentes dos experimentos de contato direto e indireto foram lavadas com PBS e fixadas em ácido acético etanol-glacial absoluto (3:1; v/v) durante 10 minutos à temperatura ambiente e finalmente coradas com Cristal Violeta a 0,1% (m/v) durante 10 minutos. O excesso de corante foi removido por decantação e lavado duas vezes com água destilada e o corante foi extraído com ácido acético a 10% (v/v). Em seguida, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços, 3 por experimento (n=9), para que a adesão fosse avaliada, e a densidade óptica foi medida a 550 nm utilizando um leitor de microplacas (leitor multi-modo SYNERGY-HTX, Biotek, EUA).

3.14 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

As células foram cultivadas em contato direto e indireto com as diferentes superfícies durante 24 horas e o mRNA total foi extraído utilizando o reagente Ambion TRIzol Reagent (Life Sciences – Thermo Fisher Scientific) e tratado com DNase I (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific). A síntese de cDNA foi realizada com o Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As reações para o estudo do padrão de expressão dos genes foram realizadas em triplicata utilizando SYBR Green Master Mix (q-PCR®, Promega) e iniciadores específicos (Primers) mostrados na Tabela 1. Para o cálculo da quantidade relativa utilizou-se o método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$, sendo os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes tendo como controle interno os genes GAPDH e β -ACTINA.

Gene (ID)	Sequência Forward	Sequência Reverse	Ciclagem qPCR
GAPDH (14433)	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC	TGCCTGCTTCACCACCTTCT	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
FAK (14083)	TCCACCAAAGAAACCACCTC	ACGGCTTGACACCCCTCATT	95 °C – 15 s; 63 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
SRC (17977)	TCGTGAGGGAGAGTGAGAC	GCGGGAGGTGATGTAGAAAC	95 °C – 15 s; 63 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
COFILINA (12631)	CAGACAAGGACTGCCGCTAT	TTGCTCTTGAGGGGTGCAIT	95 °C – 15 s; 58 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
INTEGRINA-β1 (16412)	CTGATTGGCTGGAGGAATGT	TGAGCAATTGAAGGATAATCATAG	95 °C – 15 s; 65 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
PP2A (19052)	ATGGGCCTCTCTCCCATTTCT	CATGCACAGGGAGTGACAGT	95 °C – 15 s; 59 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
TIMP2 (21858)	GCAACAGGCGTTTTGCAATG	CGGAATCCACCTCCTTCTCG	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
MMP2 (17390)	AACCTTGAGAAGGATGGCAAGT	TGCCACCCATGGTAAACAA	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
MMP9 (17395)	TGTGCCCTGGAACCTCACACGAC	ACGTCGTCCACCTGGTTACCT	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
ALP (11647)	GAAGTCCGTGGGCATCGT	CAGTGCAGTTCCAGACATAG	95 °C – 15 s; 63 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
BSP (103993)	GTACCGGCCACGCTACTTTCT	GTTGACCGCCAGCTCGTTT	95 °C – 15 s; 58 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
RUNX2 (12393)	GGACGAGGCAAGAGTTTCA	TGGTGCAGAGTTCAGGGAG	95 °C – 15 s; 63 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
BGLAP2 (12097)	AGACTCCGGCGCTACCTT	CTCGTCACAAGCAGGGTTAAG	95 °C – 15 s; 63 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
SPP1 (20750)	TTTGCTTTTGCTGTGTTGGC	CAGTCACTTTACCGGGAGG	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
DMP1 (13406)	CCCAAAACAGGAAAGGATCA	ACCAGACTGCTTCTCCTCCA	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.

Tabela 1. Sequência de primers e detalhes técnicos desenvolvidos nos ensaios de qPCR para os diferentes genes estudados em contato com pré-osteoblastos.

Gene (ID)	Sequência Forward	Sequência Reverse	Ciclagem qPCR
β-ACTINA (11461)	AGGTCTTTACGGATGTCACG	TCTTGGGTATGGAATCCTGTG	95 °C – 15 s; 55,6 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
FAK (14083)	TCCACCAAAGAAACCACCTC	ACGGCTTGACACCCCTCATT	95 °C – 15 s; 63 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
SRC (17977)	TCGTGAGGGAGAGTGAGAC	GCGGGAGGTGATGTAGAAAC	95 °C – 15 s; 63 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
P15 (1030)	GGGCAAGTGAGACGGTG	ACCCCCGCTACCTGGATT	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
CDK2 (12566)	TACCCAGTACTGCCATCCGA	CGGGTCACCAATTCAGCAA	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
CDK4 (12567)	TCGATATGAACCCGTGGCTG	TTCTCACTCTGCGTCGCTT	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
CKD6 (12571)	CGCCGATCAGCAGTATGAGT	GCCGGGCTCTGGAACTTTAT	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
TIMP1 (21857)	ATCCTCTTGTGCTATCACTG	GGTCTCGTTGATTTCTGGG	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
TIMP2 (21858)	GCAACAGGCGTTTTGCAATG	CGGAATCCACCTCCTTCTCG	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
MMP2 (17390)	AACCTTGAGAAGGATGGCAAGT	TGCCACCCATGGTAAACAA	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.
MMP9 (17395)	TGTGCCCTGGAACCTCACACGAC	ACGTCGTCCACCTGGTTACCT	95 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 30 s.

Tabela 2. Sequência de primers e detalhes técnicos desenvolvidos nos ensaios de qPCR para os diferentes genes estudados em contato com fibroblastos.

3.15 Microscopia Óptica Confocal de Fluorescência

Para avaliar o comportamento do citoesqueleto de pré-osteoblastos em resposta as diferentes superfícies, o efeito indireto foi considerado. O meio condicionado foi utilizado para tratar células que já estavam aderidas nas lamínulas por 24 horas. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com solução de PBS e fixadas usando uma solução de PBS-paraformaldeído (4% v/v) por 1 hora. Posteriormente, as células foram permeabilizadas em solução de PBS contendo 0,2% de Triton-X 100 e 1% de BSA a 37 °C durante 1 hora. Para avaliar o rearranjo do citoesqueleto, utilizou-se um anticorpo primário anti-mouse de β-Actina mAb (# 3700) por 1 hora. O anticorpo primário foi removido e as células foram lavadas delicadamente com solução de PBS por mais cinco vezes. Em seguida, o anticorpo secundário

anti-mouse IgG (H+L) AF (Alexa Fluor® 488 Conjugado) (# 4408) foi adicionado por 1 hora. Ambos os anticorpos foram adquiridos pela Cell Signaling Technology. As células foram lavadas e as lâminas de vidro foram montadas utilizando Fluorosiield com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma, Aldrich) e depois analisadas por um microscópio óptico confocal de fluorescência (LEICA, TCS SP5) (FERNANDES et al., 2018a).

3.16 Zimografia

Neste estudo, as atividades proteolíticas das enzimas Mmp2 e Mmp9 foram medidas em relação ao protocolo de zimografia à base de gelatina. O meio de cultura foi coletado para medir as atividades das MMPs dos experimentos de contato direto e indireto. O meio de cultura foi centrifugado a 13.200 xg por 15 minutos à 4 °C e armazenado a -20 °C. As amostras foram quantificadas de acordo com o método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Aplicou-se 150 ug de proteína em um gel de poliacrilamida a 12% contendo 4% de gelatina. Determinou-se a atividade gelatinolítica das proteínas envolvidas, através da renaturação utilizando solução aquosa de Triton X-100 (2% m/v) 40 minutos sob agitação à 37 °C, e tampão de proteólise (Tris-CaCl₂) incubado por 18 horas também a 37 °C. Em seguida, corou-se o gel com Azul de Coomassie (solução de corante R-250 a 0,05%) durante 3 horas e, após este período, os geis foram lavados numa solução de metanol a 30% (v/v) e ácido acético glacial a 10% (v/v). A coloração oposta foi obtida nos géis onde havia a atividade gelatinolítica (bandas) de Mmp2 (~62 kDa) e Mmp9 (~82 kDa), e então eles foram analisados utilizando o software ImageJ (Bethesda, MD) (LEFEBVRE; PEETERS-JORIS; VAES, 1991).

3.17 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes para melhor estatística, e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Uma análise de variância unidirecional (ANOVA) foi realizada utilizando o teste de Tukey para comparações múltiplas com o software GraphPad Prism7 para avaliar se as diferentes superfícies tratadas influenciavam na adesão ou diferenciação celular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Difração de Raios x (DRX)

Os dados obtidos por difratometria de Raios X (DRX) como exemplificado na **Figura 12**, indicaram a formação da fase cristalina rutilo para o TiO_2 , a qual apresenta maior resistência à corrosão. Os picos de maior intensidade mostram a formação da fase cristalina rutilo em $27,39^\circ$ (110), $36,04^\circ$ (101), $38,17^\circ$ (200), $41,22^\circ$ (111) e $44,00^\circ$ (210). Já os de menor intensidade correspondem ao titânio metálico, proveniente do substrato, em $34,86^\circ$ (100) e $39,81^\circ$ (101).

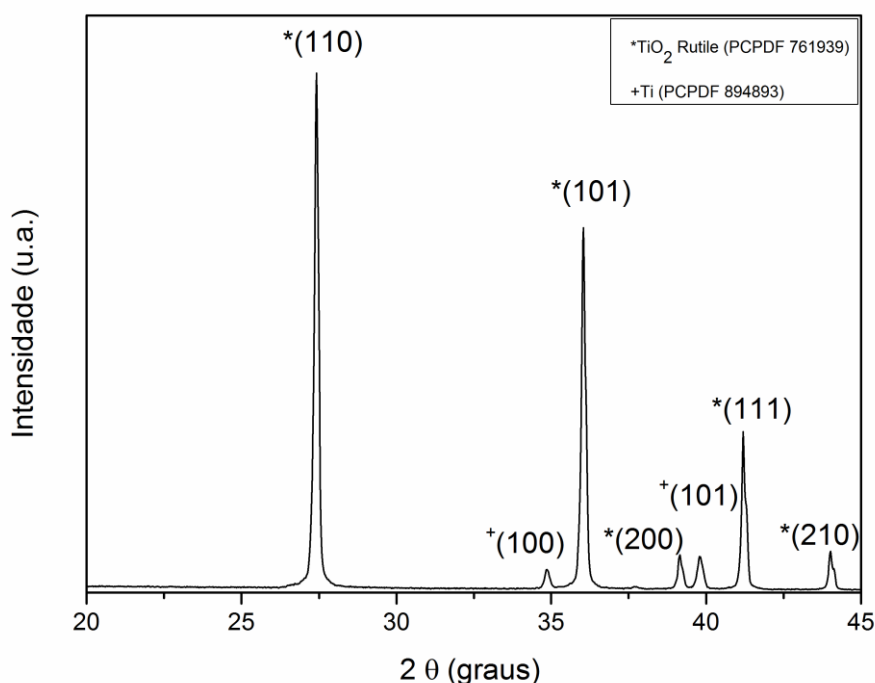


Figura 12. Difratometria de Raios X (DRX) para o filme de TiO_2 , onde é possível observar a presença de picos relacionados a fase cristalina rutilo.

4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A superfície do substrato e do filme de TiO_2 foi analisada por MEV. A **Figura 13a** apresenta as imagens de MEV do substrato polido de Ti Cp4 lixado. Nessa imagem é possível observar a rugosidade residual e alguns defeitos superficiais no substrato e algumas marcas provenientes do lixamento. Após a deposição dos filmes de TiO_2 , resultou em uma morfologia como a que pode ser observada na **Figura 13b**, que mostra a imagem

representativa de pontos distintos do filme formado. Na figura, é possível observar a formação de um filme homogêneo de TiO_2 e nanoestruturas, com espessura em torno de 500 nm (TRINO et al., 2018), cobrindo a superfície do substrato puro, característico dos filmes preparados por rotas químicas baseadas no processo sol-gel.

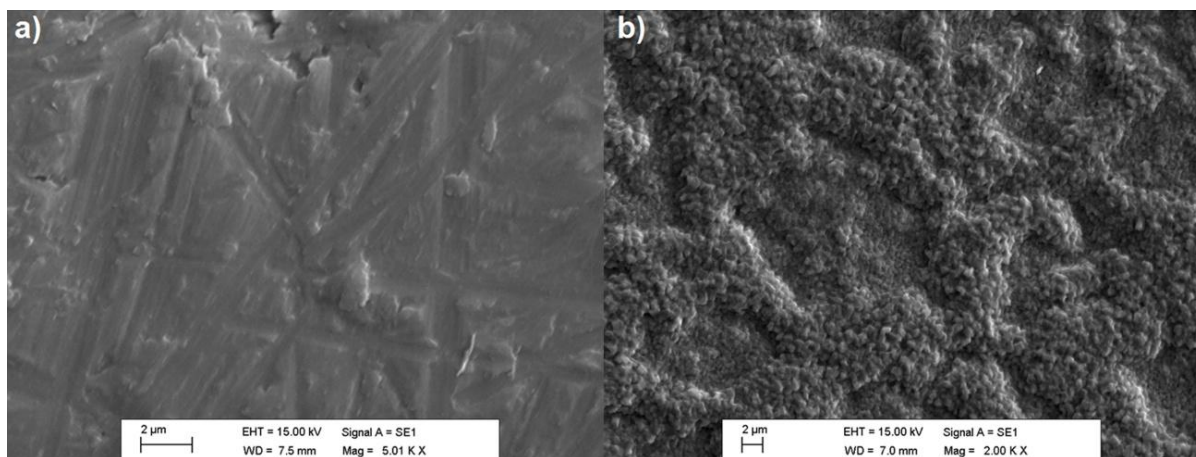


Figura 13. Imagem das superfícies por Microscopia Eletrônica de Varredura para o substrato polido de Ti Cp4 lixado até granularidade 800 (a) e para o filme fino nanoestruturado de TiO_2 depositado (b).

4.3 Microscopia Óptica Confocal

A rugosidade superficial das amostras foi investigada utilizando a Microscopia Óptica Confocal considerando a rugosidade superficial aritmética (R_a), conforme mostrado na **Figura 14**. As amostras de Ti Cp4 apresentaram um valor de R_a de aproximadamente 150 nm. No entanto, o R_a para os filmes finos de TiO_2 depositado foi em torno de 250 nm devido à presença de nanopartículas de óxido de titânio que alteraram significativamente a topografia da superfície. Após a funcionalização com alendronato, houve uma leve diminuição no valor de R_a para aproximadamente 200 nm, o que pode ser atribuído à deposição dessas moléculas nas regiões de vale, tornando a superfície mais homogênea. Por outro lado, a biofuncionalização com albumina fez com que a topografia tivesse um valor de R_a de cerca de 300 nm. Isso pode estar relacionado à deposição de albumina de maior densidade formando multicamadas devido às interações entre as frações de alendronato e hidroxilas considerando as superfícies TiO_2 +BSA e TiO_2 +ALN+BSA, respectivamente. O aumento da rugosidade da superfície do implante é um dos fatores que contribuem para adequada fixação celular (FENG et al., 2003).

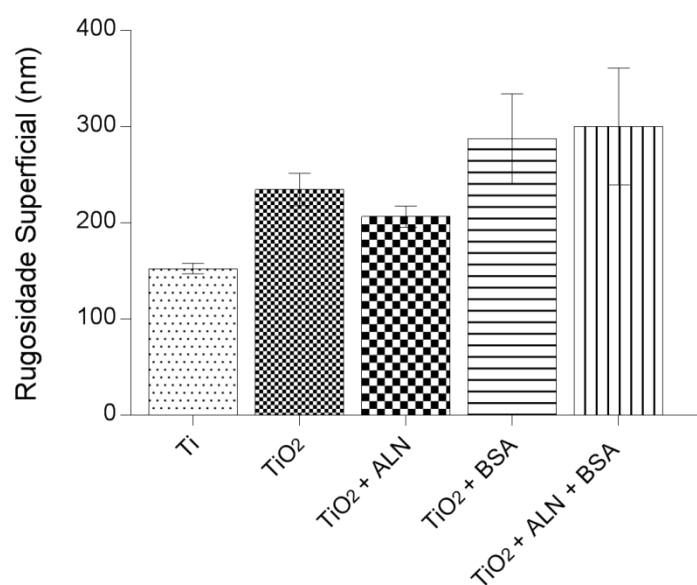


Figura 14. Rugosidade superficial medida por Microscopia Óptica Confocal de todos os grupos com as superfícies modificadas.

Nas **Figuras 15-19** encontram-se as imagens em 2D e 3D obtidas a partir da análise da rugosidade superficial das amostras de Ti Cp4 lixada, TiO₂, TiO₂+ALN, TiO₂+BSA, TiO₂+ALN+BSA, respectivamente.

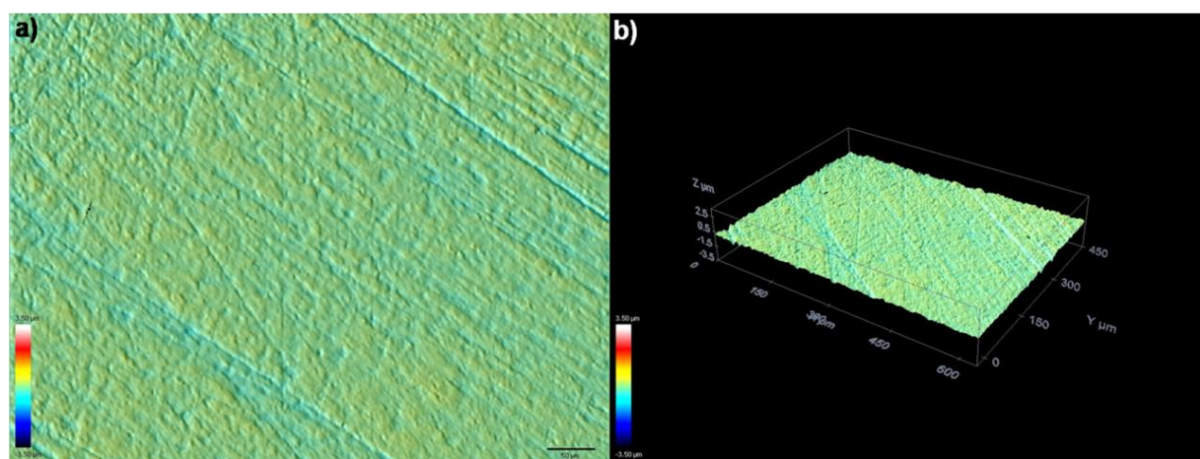


Figura 15. Imagem de Microscopia Óptica Confocal para a amostra de Ti Cp4 lixada em 2D (a) e 3D (b).

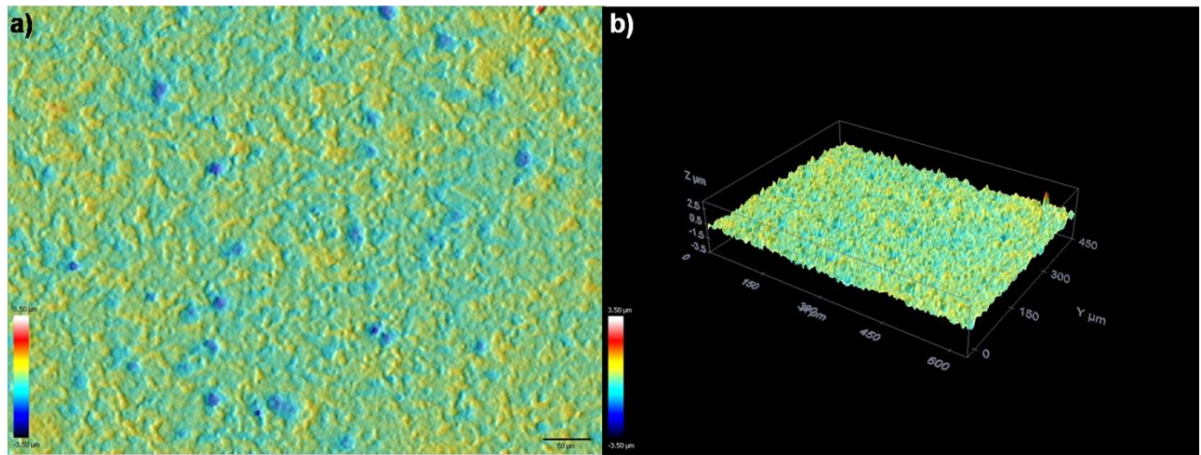


Figura 16. Imagem de Microscopia Óptica Confocal para a amostra de TiO_2 em 2D (a) e 3D (b).

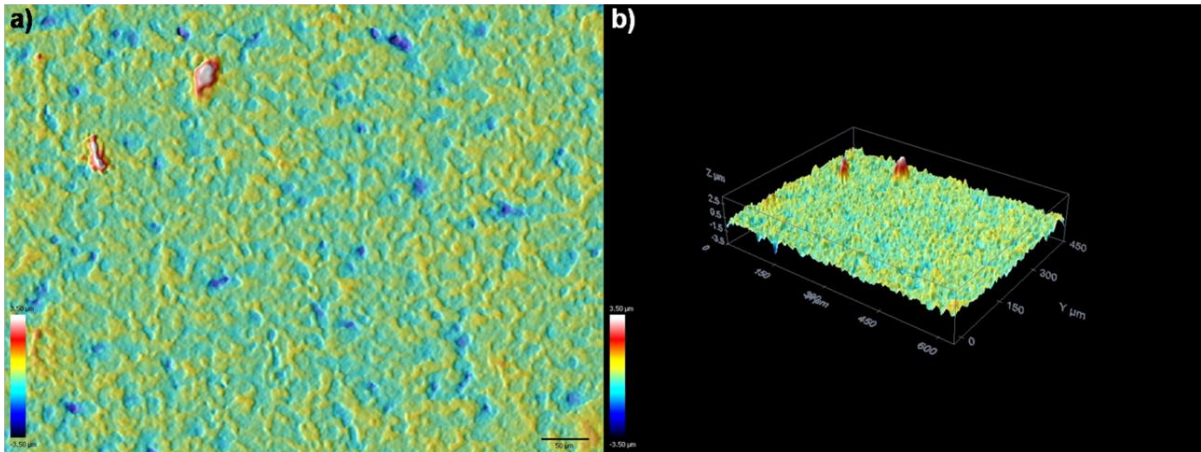


Figura 17. Imagem de Microscopia Óptica Confocal para a amostra de $\text{TiO}_2 + \text{ALN}$ em 2D (a) e 3D (b).

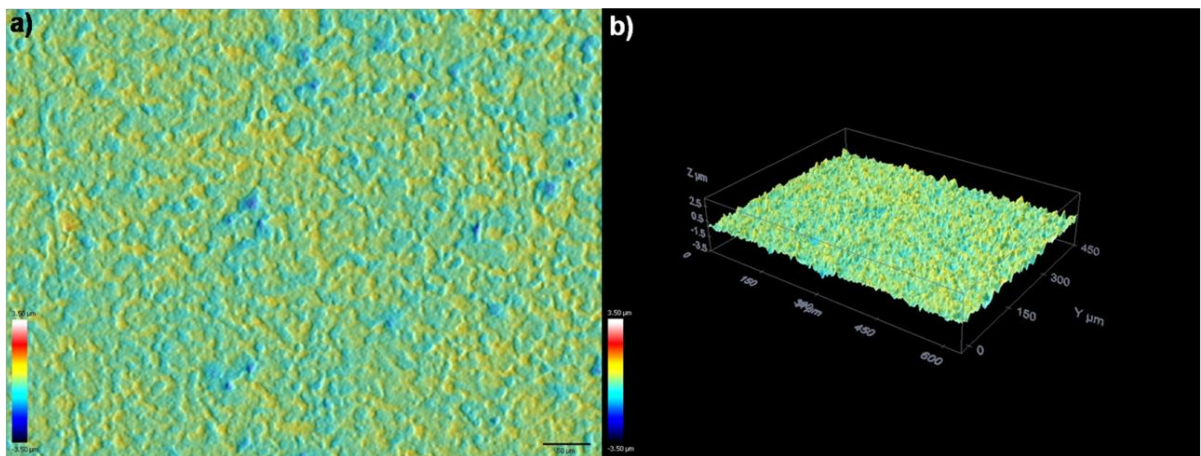


Figura 18. Imagem de Microscopia Óptica Confocal para a amostra de $\text{TiO}_2 + \text{BSA}$ em 2D (a) e 3D (b).

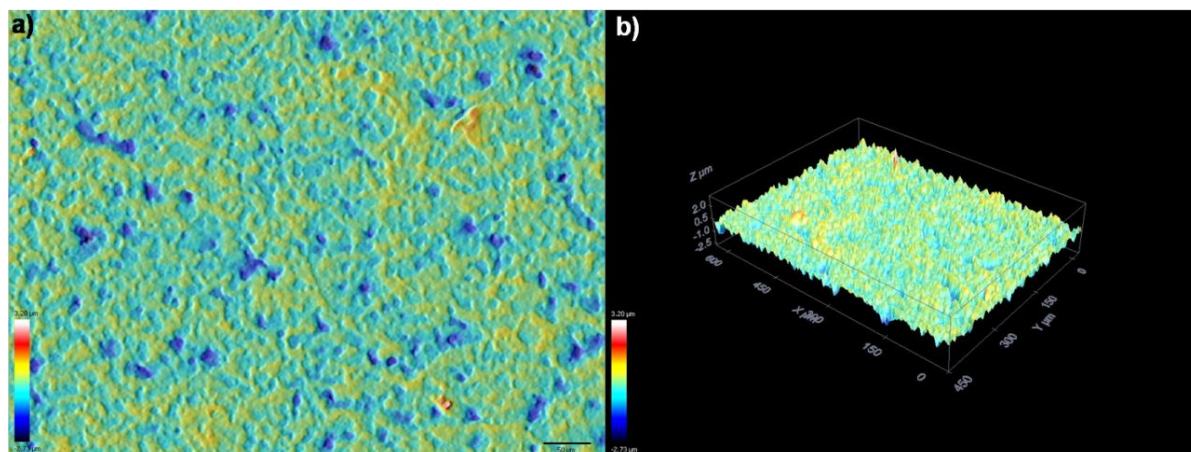


Figura 19. Imagem de Microscopia Óptica Confocal para a amostra de TiO_2 +ALN+BSA em 2D (a) e 3D (b).

4.4 Ângulo de Contato e Energia de Superfície

A **Figura 20** mostra as medidas de Ângulo de Contato (AC) e Energia de Superfície (ES) para as amostras analisadas. A superfície polida de Ti apresentou um valor de molhabilidade de 50° , enquanto o filme fino de TiO_2 apresentou um aumento expressivo na sua hidrofobicidade em relação ao Ti, apresentando um valor de AC de 40° . Após a funcionalização do filme fino de TiO_2 com as moléculas de alendronato de sódio (TiO_2 +ALN), não foram observadas alterações significativas na molhabilidade. No entanto, a BSA promoveu uma hidrofobicidade significativa à medida que os valores de AC aumentaram para aproximadamente 75° e 65° , para as amostras TiO_2 +BSA e TiO_2 +ALN+BSA, respectivamente, conforme mostrado na **Figura 20a**.

Em relação aos valores de Energia de Superfície (ES), algumas variações significativas foram observadas, conforme observado na **Figura 20b**. Os valores de ES do Ti Cp4 aumentaram após a deposição do filme fino de TiO_2 a ser depositado de 58 a 65 dyn/cm. Fases amorfas possuem energias superficiais mais baixas que as fases cristalinas (HEIM, 2015) e geralmente retém menos fortemente os sorventes de superfície. A superfície do TiO_2 rutilico (110) é termodinamicamente a mais estável na face cristal e, portanto, representa a faceta dominante das cristalinidades do rutilo (RAMAMOORTHY; VANDERBILT; KINGSMITH, 1994). As hidroxilas nas superfícies do TiO_2 (110) originam o excesso de elétrons, que estão localizados nos átomos de Ti próximos e reduzem a valência de um valor nominal de +4 a +3 (ZHANG; YANG; DONG, [s.d.]).

O excesso de elétrons não emparelhados capturados por átomos de Ti induzem uma maior energia superficial e, conseqüentemente, interações mais fortes com as moléculas

adsorventes do que o observado para o TiO_2 amorfo em Ti. A amostra de TiO_2 +ALN não apresentou alterações significativas com relação ao seu valor de energia superficial em comparação com a amostra de TiO_2 isolada. De fato, a amostra de TiO_2 +BSA apresentou uma diminuição em seu valor de ES (47 dyn/cm) em relação aos demais grupos, o que pode ser atribuído à presença de BSA na superfície. A albumina interage com a superfície do TiO_2 (grupos $-\text{OH}$) através dos grupos amina e ácido carboxílico. Além disso, as amostras de TiO_2 +ALN+BSA mostraram um valor de energia superficial ligeiramente maior que 50 dyn/cm. Este aumento na energia superficial, apesar da presença de BSA, pode ser devido aos grupos amina ($-\text{NH}_2$) e ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) da BSA, bem como os grupos $-\text{PO}_3$ do alendronato.

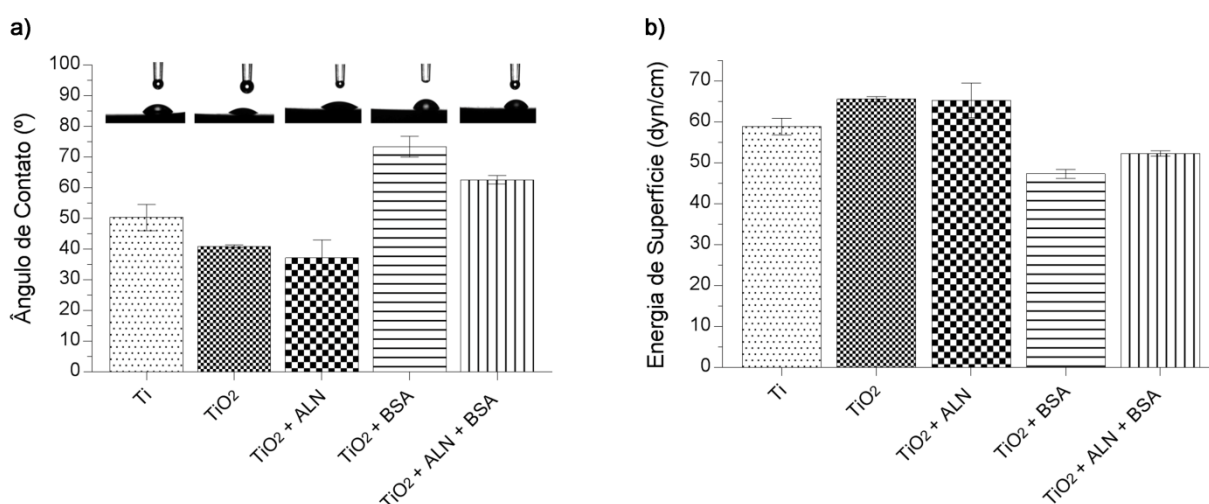


Figura 20. Medidas de Ângulo de Contato (a) e de Energia de Superfície (b) para as amostras Ti Cp4, TiO_2 , TiO_2 +ALN, TiO_2 +BSA e TiO_2 +ALN+BSA.

4.5 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios x (XPS)

Além disso, foram realizados experimentos de XPS para melhor analisar as composições químicas das superfícies e os estados eletrônicos dos materiais funcionalizados. O espectro *survey* de TiO_2 (Figura 21) enfatiza a presença do filme de TiO_2 , devido ao pico de maior intensidade do O 1s.

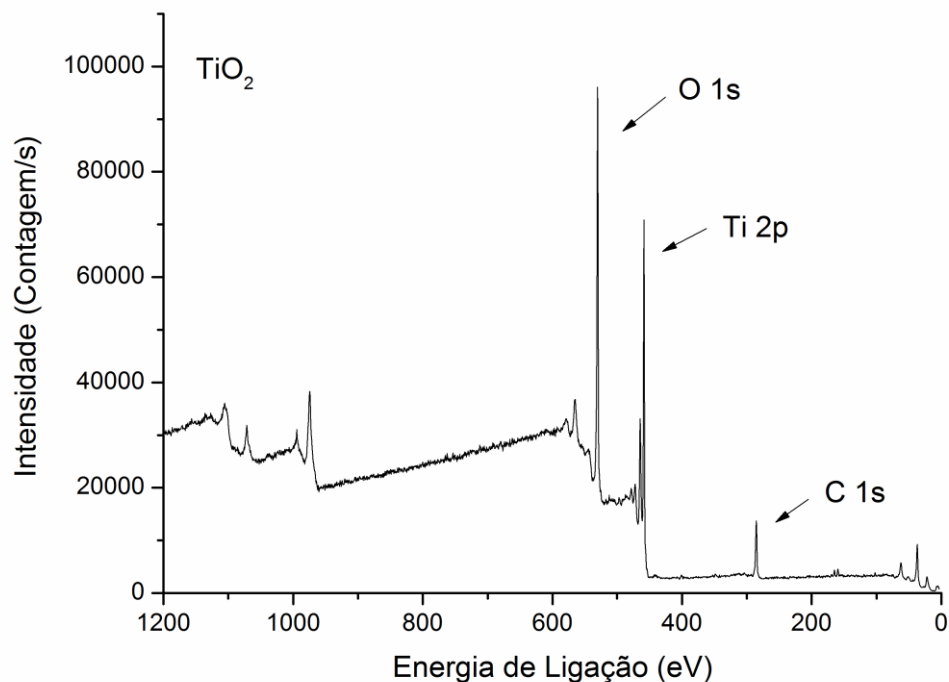


Figura 21. Espectro survey de XPS para a amostra de TiO_2 .

A **Figura 22** mostra os espectros de alta resolução da amostra de TiO_2 . As contribuições do $\text{Ti } 2p_{1/2}$ (464,4 eV) e $\text{Ti } 2p_{3/2}$ (458,7 eV) (MOULDER et al., 1992), como mostrado na **Figura 22a**, são dois picos associados com as contribuições do metal base e tem uma diferença de energia de 5,7 eV, que é consistente com o estado de oxidação Ti^{+4} apresentado em TiO_2 . O espectro de alta resolução para o pico de O 1s (**Figura 22b**) é a deconvolução de três picos. Os dois picos de baixa energia estão relacionados às ligações de óxidos metálicos de TiO_2 (MOULDER et al., 1992) e a terceira contribuição tem a energia mais alta e está relacionada ao oxigênio da ligação Ti-OH (SHAHNAS BEEGAM; NARENDRANATH; PERIYAT, 2017).

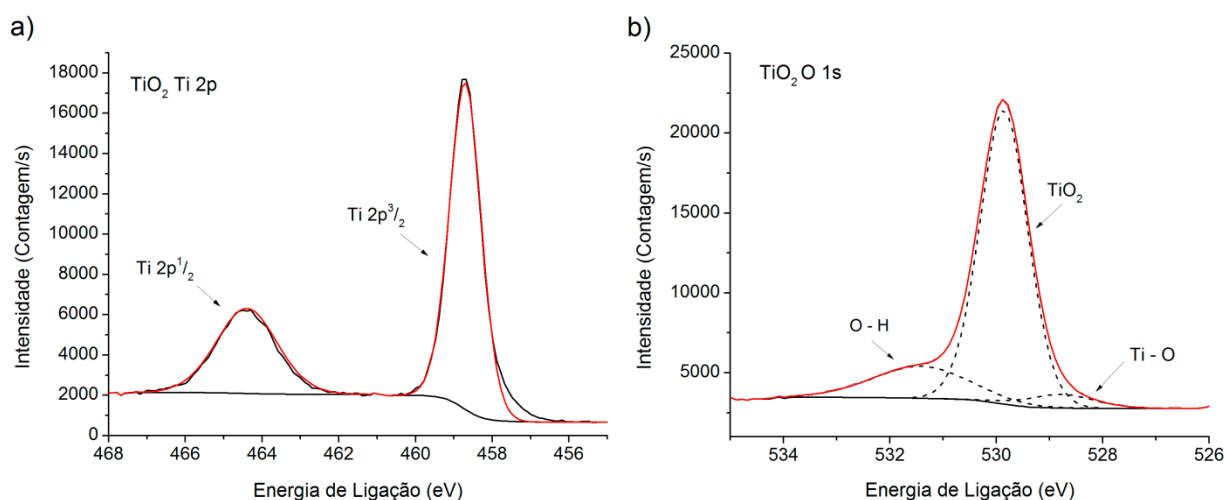


Figura 22. Espectro de alta resolução do Ti 2p **(a)** e espectro de alta resolução do O 1s **(b)**, ambos para o filme de TiO₂.

A **Figura 23** mostra a presença dos picos O 1s, Ti 2p, N 1s, P 2p e C 1s para as superfícies funcionalizadas com alendronato (TiO₂+ALN). A presença dos picos N 1s e P 2p no espectro *survey* está relacionada aos elementos nitrogênio e fósforo do alendronato, validando a presença dessa molécula na superfície.

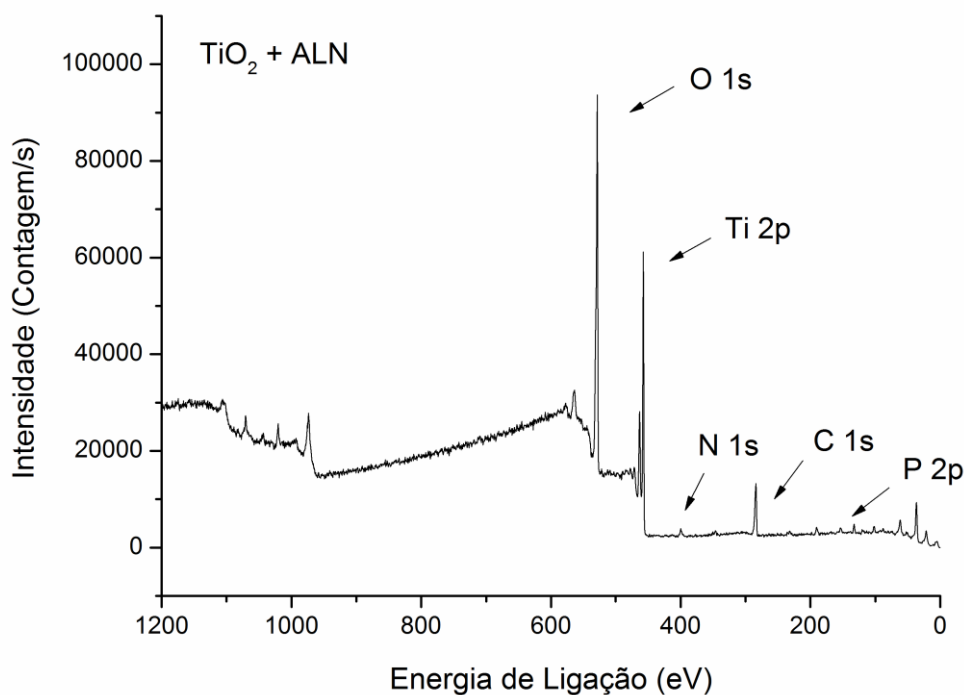


Figura 23. Espectro *survey* para a amostra de TiO₂+ALN.

O espectro de O 1s (**Figura 24a**) mostra um pico a 532,0 eV associado ao P–O/OH (ZHANG et al., 2017), que também está relacionado ao alendronato. O pico de Ti–O com energia de ligação de 530,0 eV indica a presença da camada de óxido (NARAYAN et al., 2013). Existem três contribuições diferentes para o pico C 1s (**Figura 24b**) em 285,3 eV (C–C), 286,7 eV (C–OH/C–N) (SEOP LEE; HOON SHIN; JANG, 2015) e 289,3 eV (C–PO (OH)₂) (KAČIULIS et al., 1998). A presença das ligações C–N e C–PO (OH)₂ confirmam a existência do alendronato na superfície. Finalmente, o espectro N 1s (**Figura 24c**) confirma a funcionalização devido ao pico NH₃⁺ (HUNKE et al., 2015) em 401,2 eV e a ligação orgânica C–N a 399,2 eV (SEOP LEE; HOON SHIN; JANG, 2015). A presença de NH₃⁺ sugere que ele poderia ser gerado pela formação de uma estrutura amina zwitteriônica, que favorece a adsorção através do grupo C–PO (OH)₂ (ATAMAN et al., 2011; NECHIKKATTU; PARK; HA, 2019). A **Figura 24d** mostra o espectro de alta resolução para P 2p, que contém duas contribuições, P 2p_{1/2} (134,5 eV) e P 2p_{3/2} (133,3 eV) (MOULDER et al., 1992), confirmando a presença de alendronato na superfície do TiO₂.

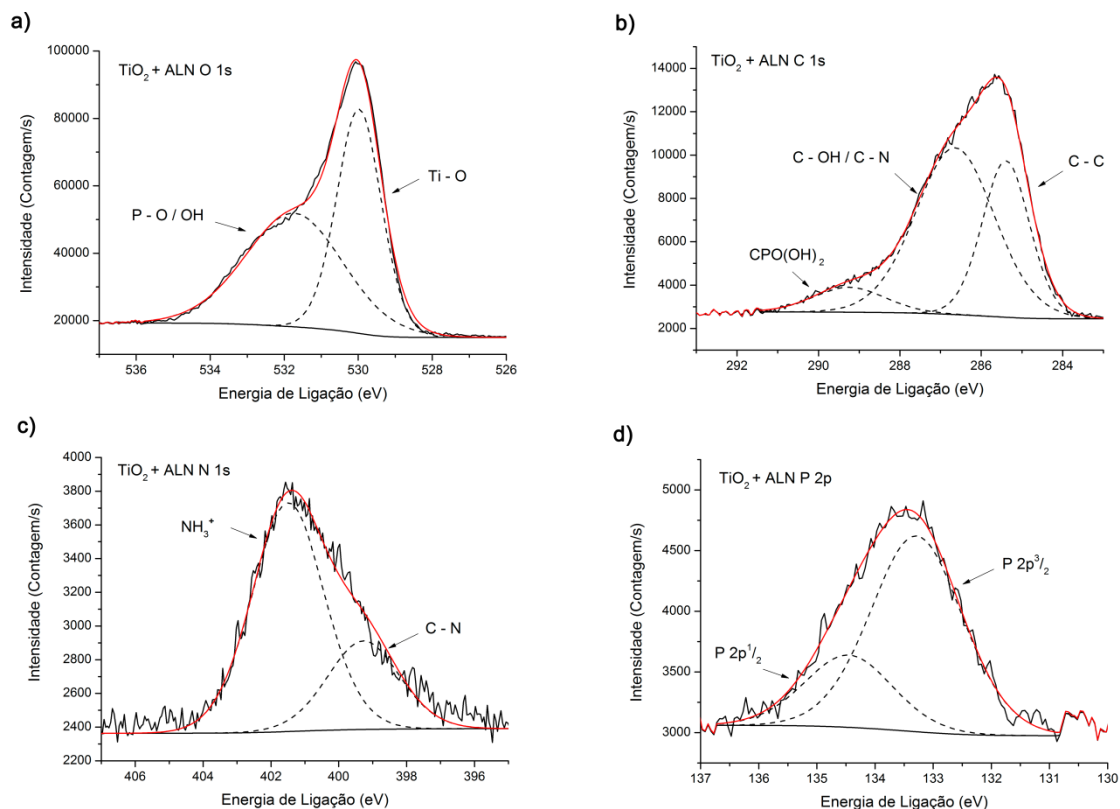


Figura 24. Espectro de alta resolução do O 1s **(a)**, espectro de alta resolução do C 1s **(b)**, espectro de alta resolução do N 1s **(c)** e espectro de alta resolução para P 2p **(d)**, todos para a amostra de $\text{TiO}_2 + \text{ALN}$.

As superfícies funcionalizadas com albumina também foram analisadas, como mostra a **Figura 25**. O espectro *survey* de $\text{TiO}_2 + \text{BSA}$ demonstra uma energia de ligação aumentada para N 1s e C 1s em comparação com as superfícies funcionalizadas com alendronato, talvez devido a composição química da albumina (GOMES et al., 2020).

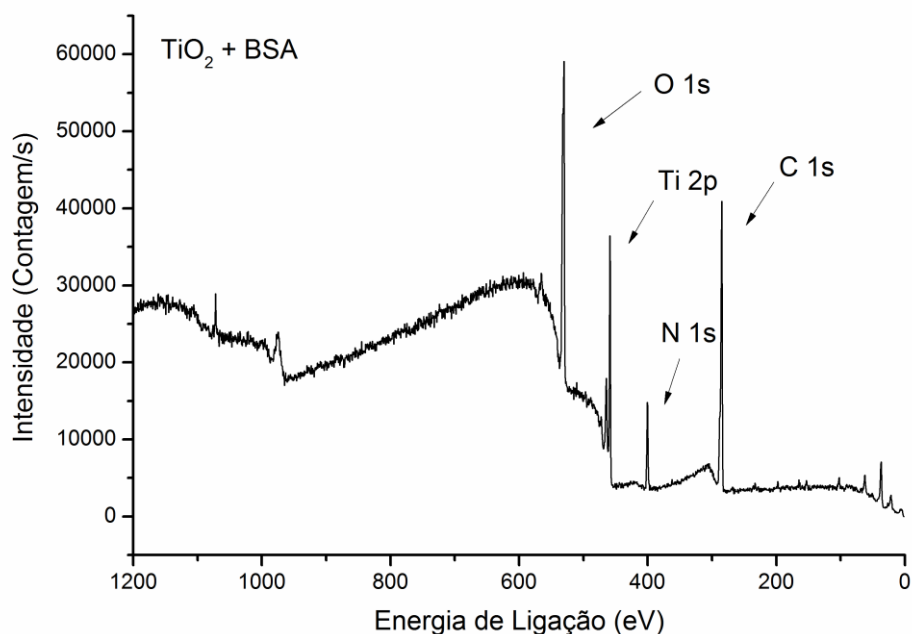


Figura 25. Espectro *survey* para a amostra TiO_2 +BSA.

O espectro de O 1s (**Figura 26a**) contém os picos de OH (531,8 eV) e Ti-O (529,9 eV) (WANG et al., 2015) para as ligações de titânio. Há também três contribuições presentes para o espectro de C 1s (**Figura 26b**), todas relacionadas à funcionalização da albumina. O espectro de N 1s (**Figura 26c**) mostra que o pico em 401,5 eV (HUNKE et al., 2015) está relacionado à presença de NH_3^+ na molécula de albumina, assim como o pico de C-N de alta intensidade.

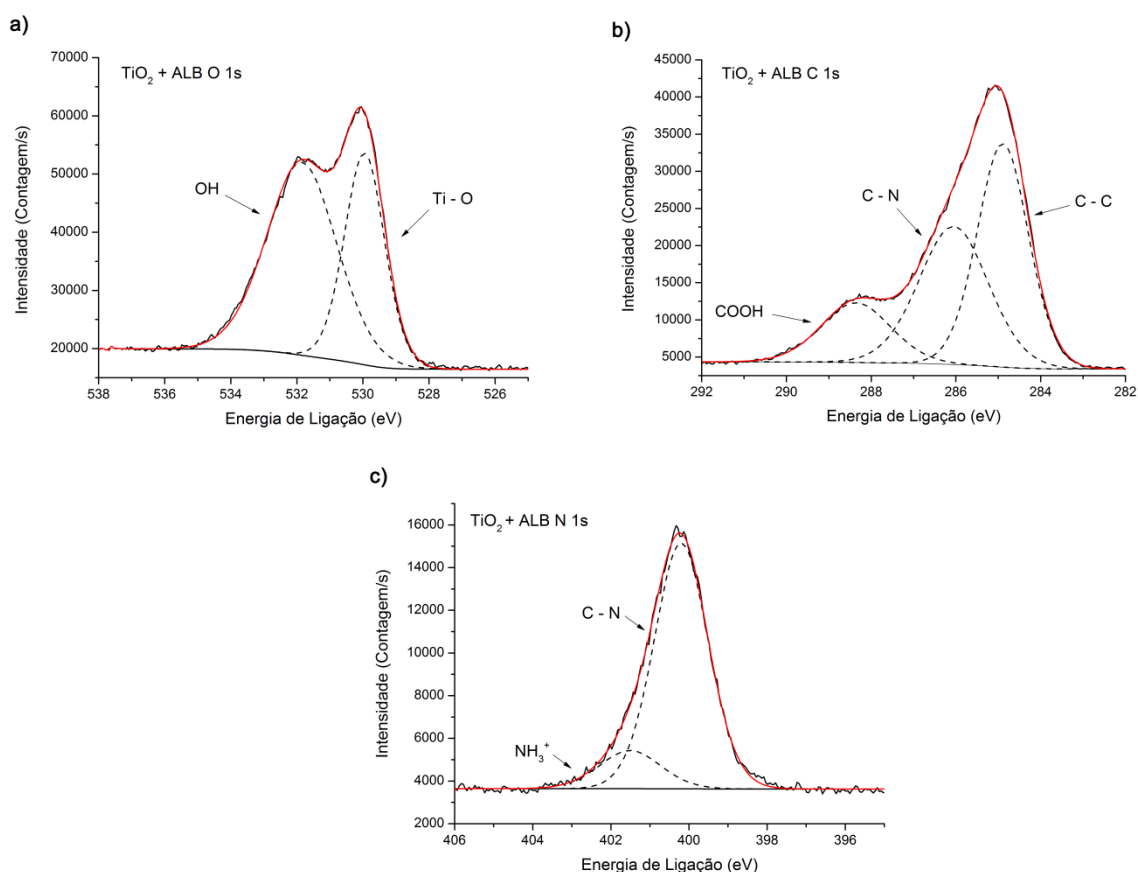


Figura 26. Espectro de alta resolução do O 1s **(a)**, espectro de alta resolução do C 1s **(b)** e espectro de alta resolução do N 1s **(c)**, todos para a amostra de $\text{TiO}_2 + \text{BSA}$.

Adicionalmente, o espectro *survey* de $\text{TiO}_2 + \text{ALN} + \text{BSA}$ mostrado na **Figura 27**, tem picos associados a funcionalização dos dois compostos.

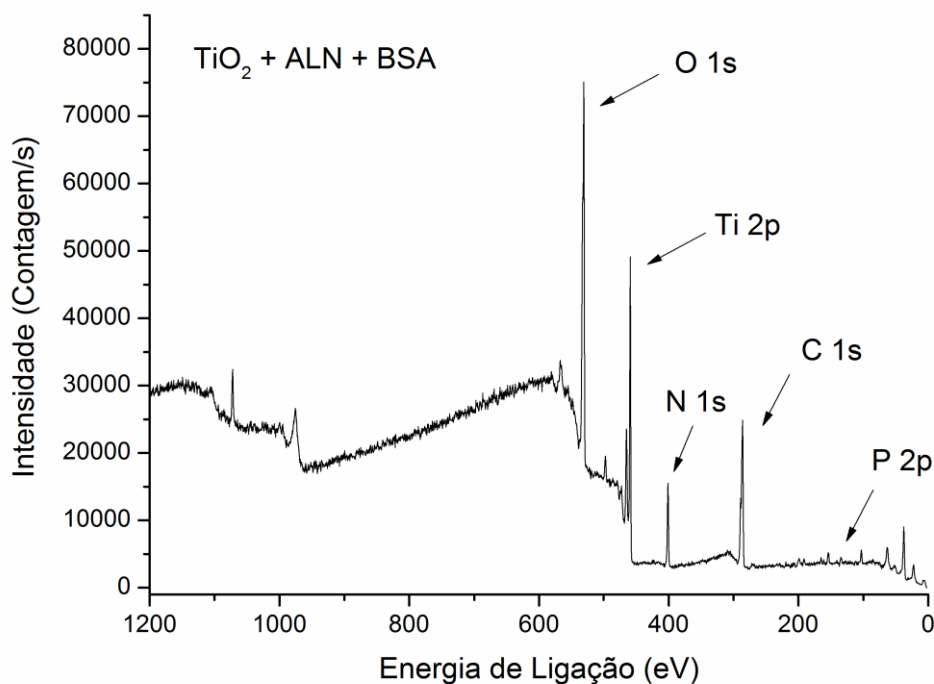


Figura 27. Espectro *survey* para a amostra $\text{TiO}_2 + \text{ALN} + \text{BSA}$.

O espectro de alta resolução de O 1s na **Figura 28a**, mostra contribuições de OH (531,9 eV) e Ti-O (530,0 eV) que foram quase os mesmos que a funcionalização com albumina. Para o espectro de C 1s (**Figura 28b**), existem três contribuições diferentes como COOH / C-PO (OH)₂, C-N e C-C. A presença dos grupos COOH são devido à albumina, enquanto os grupos C-PO (OH)₂ são do alendronato. No espectro N 1s (**Figura 28c**), foram encontradas contribuições do NH_3^+ (401,2 eV) e C-N (400,3 eV) (HUNKE et al., 2015), que podem estar relacionados à funcionalização efetiva do alendronato e da albumina.

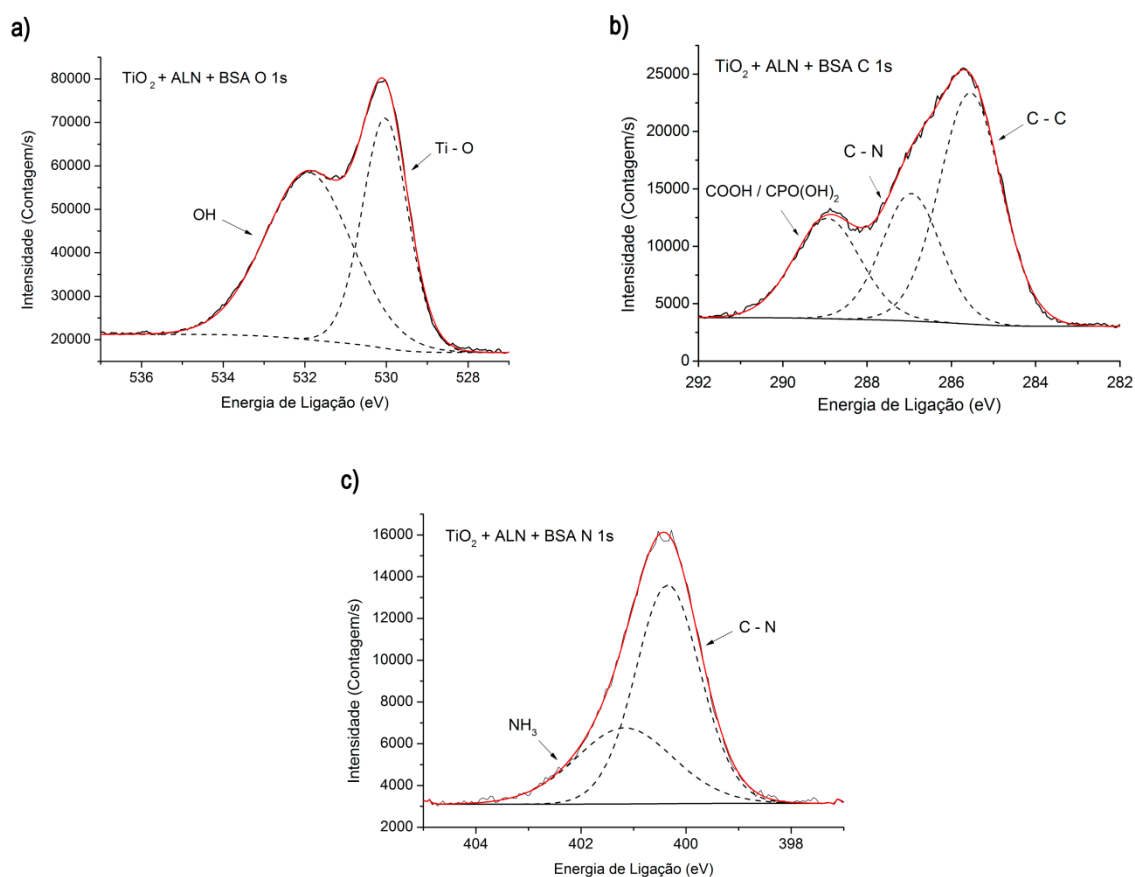


Figura 28. Espectro de alta resolução do O 1s **(a)**, espectro de alta resolução do C 1s **(b)** e espectro de alta resolução do N 1s **(c)**, todos para a amostra de $\text{TiO}_2 + \text{ALN} + \text{BSA}$.

4.6 Modelos possíveis para a fixação das moléculas

Os resultados obtidos pela técnica de XPS permitiram conjecturas sobre possíveis configurações geométricas de ligação entre o alendronato e a superfície do filme. A adsorção de moléculas de alendronato na superfície do TiO_2 pode ocorrer através de ligações de hidrogênio ou de imobilização covalente (**Figura 29**). As ligações de hidrogênio podem se formar entre os grupos $-\text{OH}$ presentes na superfície do TiO_2 e os grupos $-\text{NH}_2$, $=\text{O}$ ou $-\text{OH}$ do alendronato (**Figura 29a**). A imobilização do alendronato na superfície do TiO_2 envolve a condensação entre os grupos $\text{P}-\text{OH}$ e $\text{Ti}-\text{OH}$ para formar unidades de ligação monodentadas (**Figura 29b**) (ZHENG; NEOH; KANG, 2017). Além disso, a coordenação do oxigênio fosforil em Ti pode formar unidades de ligações bidentadas (**Figura 29c**) (BRONZE-UHLE et al., 2019a). Para mais, as ligações de hidrogênio podem se formar através dos grupos $\text{P}-\text{OH}$ e $\text{P}=\text{O}$, remanescentes nos sítios de alendronato imobilizados na superfície entre moléculas

adjacentes monodentadas ou bidentadas de alendronato, ou com grupos hidroxilas localizados no substrato.

A albumina pode ser adsorvida diretamente na superfície do filme através de atraentes interações eletrostáticas com grupos -OH do TiO_2 , ou através de ligações covalentes entre os sítios da albumina e os grupos funcionais do alendronato imobilizado na superfície do TiO_2 . Quando o valor de pH é 7,4, que é o caso da deposição realizada, a albumina tem uma estrutura semelhante ao coração (isoforma N) com uma carga total de -9 na superfície da proteína devido a resíduos de asparagina (ASP) e glutamina (GLU), que possuem carga negativa, e Histidina (HIS), Lisina (LYS) e Arginina (ARG), que são carregadas positivamente (BALER et al., 2014). Longe do ponto isoelétrico, com um valor de pH de 7,4 (pH usado para a deposição), a agregação da albumina procedeu através da formação de agregados ordenados relativamente pequenos (oligômeros) (VETRI et al., 2007), que podem formar multicamadas na superfície. Devido aos vários possíveis modos de ligação e conformações da albumina que podem ocorrer, é difícil prever as distribuições das ligações químicas ou a estrutura superficial exata.

... Ligação de Hidrogênio

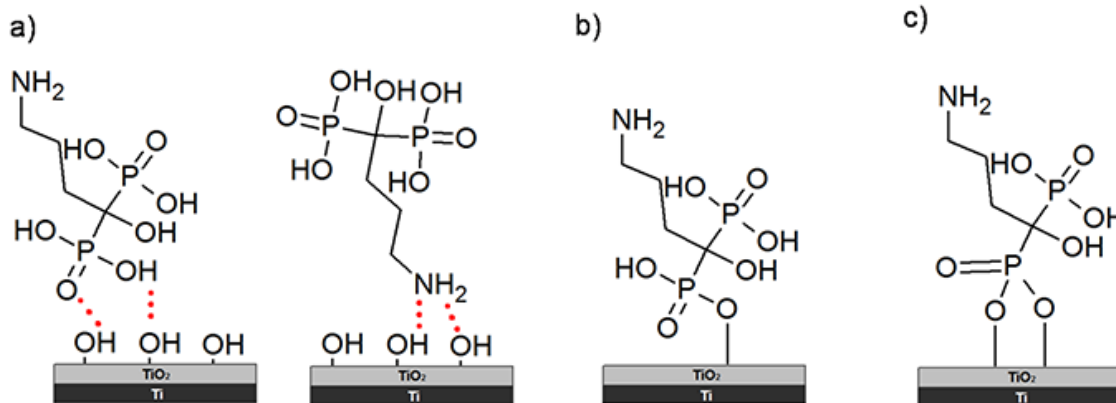


Figura 29. Diagrama esquemático que demonstra os possíveis modelos para a fixação das moléculas de alendronato. O alendronato pode ligar-se através de ligação de hidrogênio **(a)**, ligação monodentada **(b)** ou unidades de ligações bidentadas **(c)**. Fonte: adaptado de TRINO et al., 2018.

4.7 Testes biológicos com pré-osteoblastos (MC3T3)

4.7.1 Testes em contato direto com as superfícies

Nas últimas décadas, há um interesse crescente no desenvolvimento de biomateriais que interajam biologicamente com as propriedades do tecido ósseo autógeno, melhorando o processo de osseointegração e provável redução de falhas do implante. Um fator importante a ser considerado são as propriedades da superfície do biomaterial, uma vez que é a primeira parte dos dispositivos implantados em contato com os tecidos hospedeiros e espera-se que posteriormente conduza o comportamento celular (DA COSTA FERNANDES et al., 2018b). No entanto, foram realizadas diferentes modificações nas superfícies à base de titânio e, após realizar testes *in vitro* para definir o comportamento biológico das células osteoblásticas que respondem às superfícies, foram analisados a adesão celular, o remodelamento da MEC e o fenótipo osteoblástico dessas células, uma vez que consideramos como resultados importantes a serem avaliados em resposta a superfícies à base de titânio.

O perfil de adesão celular foi estimado cultivando pré-osteoblastos com as superfícies modificadas por 24 horas. A **Figura 30a** mostra que todas as superfícies apresentaram uma melhor adesão do que o grupo controle (Ti), onde o melhor desempenho foi no grupo TiO₂+ALN+BSA. A viabilidade celular pelo ensaio de MTT também foi avaliada e a **Figura 30b** mostra o resultado preliminar da atividade mitocondrial. Uma redução de desidrogenases mitocondriais devido à adesão celular nas superfícies modificadas foi observada. Esen e Long (2014) sugeriram que osteoblastos diferenciados diminuem a atividade mitocondrial, optando a um metabolismo energético anaeróbico, não requerendo atividade mitocondrial neste processo (ESEN; LONG, 2014). Desta forma, nestas condições experimentais, é sugerido que os materiais avaliados poderiam estar interferindo em eventos de diferenciação destas células.

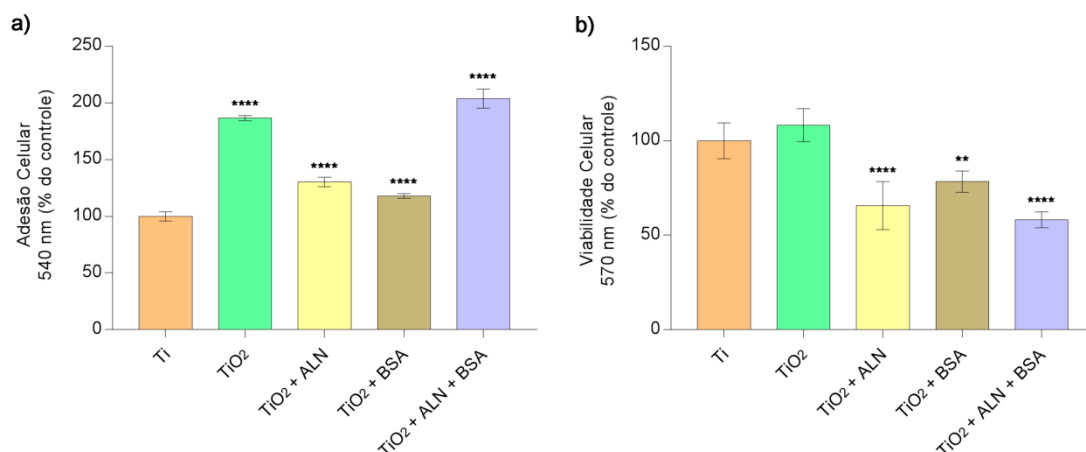


Figura 30. Ensaios de adesão celular por Cristal Violeta **(a)** e ensaio de viabilidade celular por MTT **(b)** nas diferentes superfícies em contato direto pelo período de 24 horas. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. ** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$).

Para entender melhor os mecanismos intracelulares envolvidos nos eventos de adesão, o genes relacionados à adesão celular foram avaliados utilizando a tecnologia qPCR. A análise de qPCR mostra que houve uma diminuição significativa na expressão gênica de Integrina- β 1 em todas as superfícies modificadas (**Figura 31a**). Biologicamente, estes resultados podem ser interpretados de diferentes maneiras, destacando a regulação pós-transcricional ocorrida. A redução significativa da expressão da Integrina- β 1 pode estar relacionada ao aumento desta proteína em resposta as diferentes superfícies, refletindo em uma queda da expressão deste gene como observado na **Figura 31a**; outros mecanismos a serem considerados são eventuais regulações pós transcricionais via microRNAs. Ao falar sobre adesão celular através do envolvimento de Integrinas, é necessário destacar que se trata de uma família de subunidades capaz de guiar estes eventos biológicos e nem sempre todos os seus membros são requeridos, desta maneira, pode-se afirmar também que não houve a necessidade biológica da expressão aumentada de Integrina- β 1, porém, para conclusões mais robustas neste sentido, ensaios adicionais são necessários, destacando o envolvimento de outros genes codificantes dos demais membros desta família (PARK et al., 2015). Adicionalmente, a plataforma de adesão focal foi analisada através da avaliação da expressão gênica de Fak (**Figura 31b**) e Src (**Figura 31c**) (pois ambos são responsáveis por codificar a proteína relacionada com pontos de adesão focais), onde foi descoberto que há reduções significativas para ambas as ativações gênicas, com exceção na expressão de Src no grupo TiO₂+ALN. É razoável sugerir que ambos os genes, Fak e Src, apresentaram um padrão de

expressão inferior ao controle provavelmente por já existir quantidade proteica suficiente para desempenhar a função de ponto de adesão focal no momento da adesão das células sobre os materiais.

Geralmente a adesão celular requer mudanças profundas na morfologia celular através da maquinaria relacionada ao citoesqueleto (DA COSTA FERNANDES et al., 2018a). Assim, para testar esse conceito, os transcritos dos genes Pp2A (**Figura 31d**) e Cofilina (**Figura 31e**) que codificam as proteínas Pp2A e Cofilina, respectivamente, foram avaliados, pois é importante para compreender o comportamento desses genes. Isso foi realizado após perceber o envolvimento da Cofilina durante a adesão de pré-osteoblastos nas superfícies dos diferentes biomateriais. Além disso, o Pp2A, como uma fosfatase de Ser/Thr, poderia modular a atividade da Cofilina através da desfosforilação transitória de Ser03. O equilíbrio dessas duas ações rege o rearranjo do citoesqueleto baseado em actina. Os resultados mostram uma exigência dinâmica para os genes Pp2A e Cofilina durante os mecanismos iniciais da resposta do sistema aos materiais. Assim, as superfícies de TiO₂+BSA e TiO₂+ALN+BSA exigem perfis de Pp2A mais altos do que as superfícies Ti, TiO₂ e TiO₂+ALN.

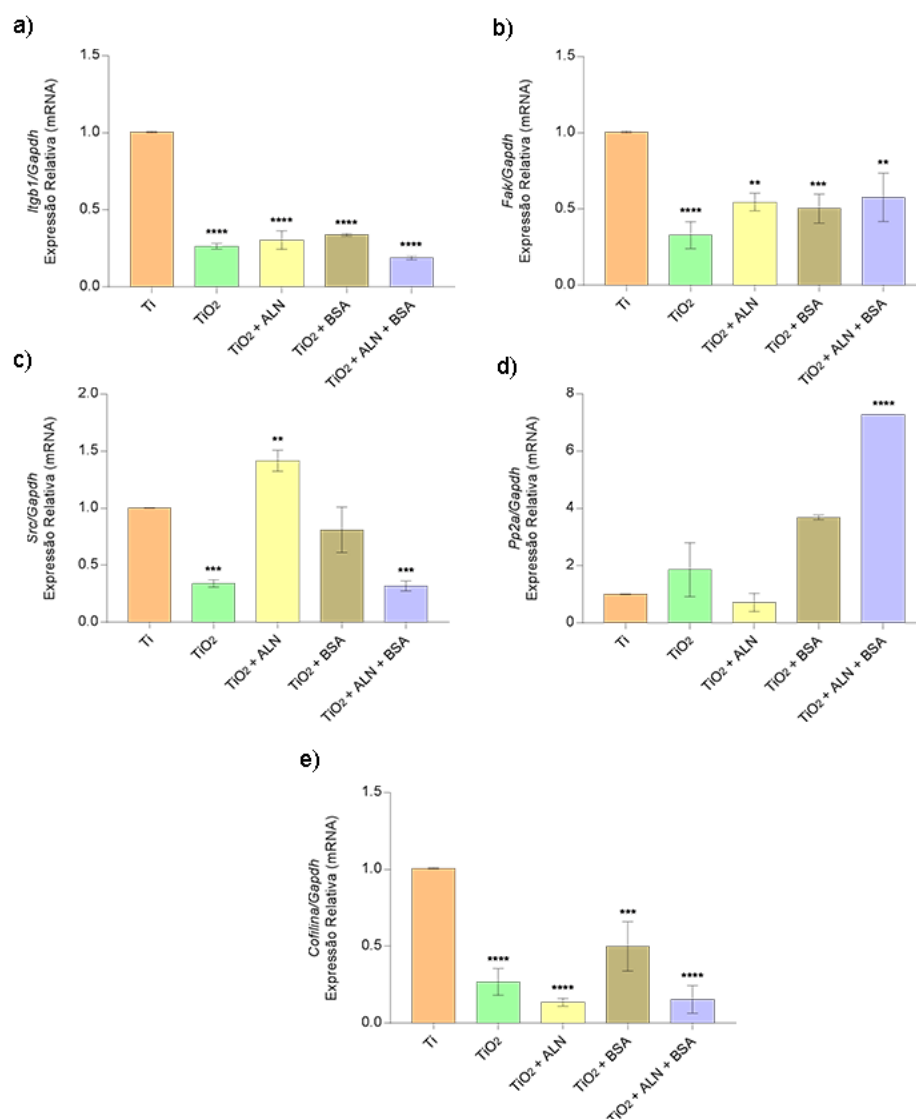


Figura 31. Expressão gênica de genes relacionados à adesão celular: Integrina- β 1 **(a)**, Fak **(b)**, Src **(c)**, Pp2A **(d)** e Cofilina **(e)**, em contato direto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. ** ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$).

Estes resultados iniciais de interação com essas superfícies foram decisivos para os eventos subsequentes do desempenho celular e podem até contribuir para importantes eventos biológicos de rearranjo da matriz através da atividade das metaloproteinases (MMPs) (DA COSTA FERNANDES et al., 2018b; FERNANDES et al., 2018b; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2005). Com base nessa afirmação, os genes relacionados à MEC foram avaliados, considerando o comportamento das atividades gênicas e atividades gelatinolíticas das MMPs pela técnica de Zimografia. Os dados mostram um panorama das ativações para Timp2 **(Figura 32a)**, Mmp2 **(Figura 32b)** e Mmp9 **(Figura 32c)**. Com exceção da Mmp9 em

resposta ao TiO₂+ALN (**Figura 32c**), o perfil dos genes relacionados à MEC foi modulado para baixo quando as respostas superficiais biofuncionalizadas foram comparadas com o titânio polido (Ti), grupo este utilizado como controle experimental. Além disso, um perfil semelhante foi observado para as atividades de MMPs, o que reflete uma baixa rotatividade da MEC nesta fase da resposta adaptativa às superfícies (**Figura 32d-j**).

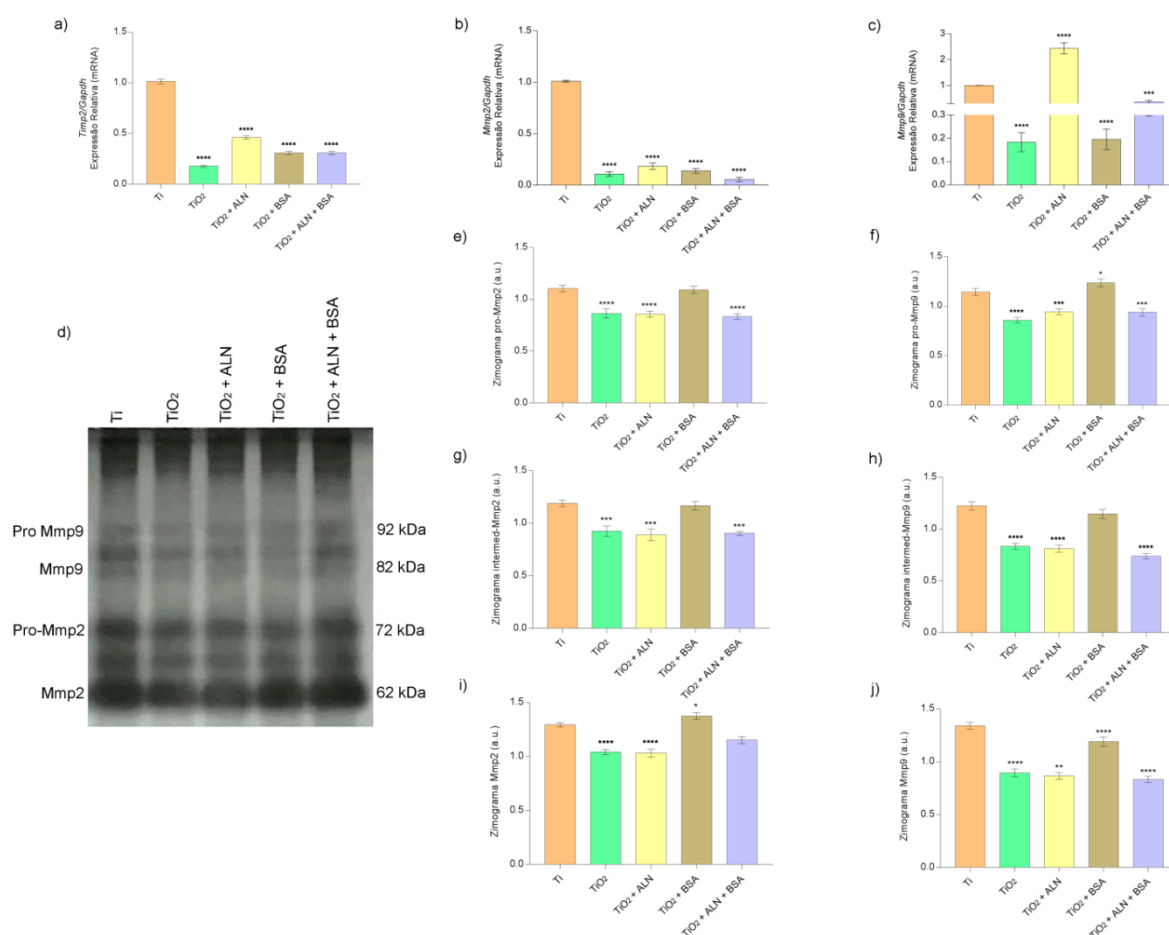


Figura 32. Expressão gênica de genes envolvidos no rearranjo da matriz extracelular: Timp2 (**a**), Mmp2 (**b**) e Mmp9 (**c**), em contato direto, utilizando a tecnologia q-PCR. As análises para a atividade enzimática das MMPs foram realizadas utilizando a técnica de Zimografia. Degradações da gelatina demonstrada por SDS-PAGE revelaram a faixa de atividade relativa para as gelatinases (**d**), além das análises estatísticas para as atividades de Mmp2 (**e, g, i**) e Mmp9 (**f, h, j**). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * e ** ($p < 0,05$), *** e **** ($p < 0,001$).

Considerando um período de curto prazo, quando as células foram expostas às diferentes superfícies por até 24 horas, os resultados mostraram que, durante a adesão celular, houve um desencadeamento do estímulo osteogênico que poderia conduzir à diferenciação pré-osteoblástica tardia e aos fenótipos osteogênicos. Especificamente, esse fenótipo

osteogênico foi abordado pela avaliação da expressão (mRNA) dos seguintes genes: Fator de transcrição relacionado ao RUNT2 (Runx2), Fosfatase Alcalina (Alp), Sialoproteína Óssea (Bsp), Osteopontina (Spp1), Osteocalcina (Bglap2) e Proteína da Matriz Dentinária 1 (Dmp1) (**Figura 33**). Embora fosse relevante, a atividade do gene Runx2 não foi estatisticamente significativa após a comparação de todas as superfícies, mas foi modulada negativamente em comparação com o controle (Ti) (**Figura 33a**). É importante ressaltar que o gene Alp também foi necessário nessa resposta inicial às superfícies (**Figura 33b**), enquanto espera-se que sua atividade seja aprimorada nos estágios posteriores da diferenciação e osteogênese dos osteoblastos em torno dos dispositivos implantáveis. A Bsp foi significativamente superexpressa em resposta ao TiO₂+ALN (aumento de aproximadamente 6 vezes com relação ao controle, **Figura 33c**). Todas as funcionalizações diminuíram seus padrões de transcrição para o gene Spp1 (**Figura 33d**), enquanto o gene codificador Bglap2 teve um aumento de 6 vezes que foi expresso também em resposta ao TiO₂+ALN, como mostra a **Figura 33e**. Além disso, o gene Dmp1 foi significativamente modulado para baixo, conforme o esperado (**Figura 33f**), uma vez que está relacionado aos estágios posteriores da diferenciação dos osteoblastos e ao início da transição osteoblastos/osteócitos.

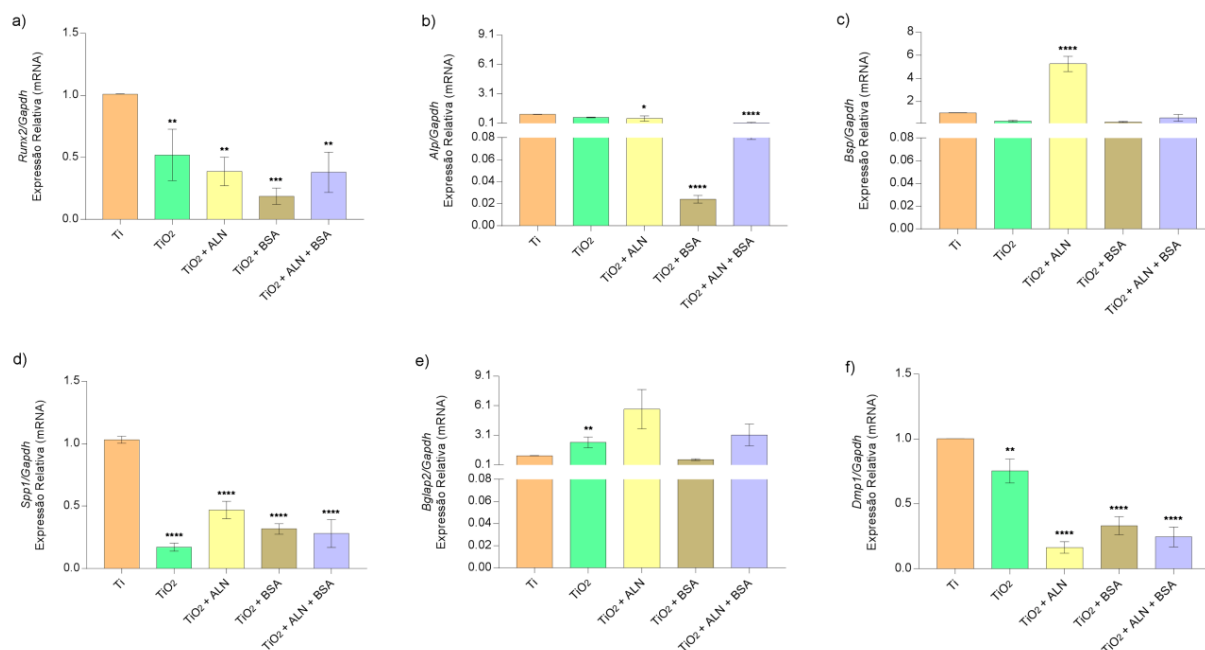


Figura 33. Expressão gênica de genes relacionados à diferenciação celular: Runx2 **(a)**, Alp **(b)**, Bsp **(c)**, Spp1 **(d)**, Bglap2 **(e)** e Dmp1 **(f)** em contato direto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * e ** ($p < 0,05$), *** e **** ($p < 0,001$).

4.7.2 Testes em contato indireto com as superfícies

Considerando o dinamismo da biologia do organismo em responder a dispositivos implantáveis, mostramos anteriormente que as células respondem naturalmente em contato direto com as superfícies, mas também é necessário considerar os efeitos indiretos, um pouco relacionados ao efeito deles nas respostas desencadeantes, principalmente considerando as células vizinhas (ROSSI et al., 2017).

Primeiramente a adesão celular foi avaliada com Cristal Violeta e uma padronização do número de células aderidas foi observada em todos os grupos (**Figura 34a**). Em seguida, foi verificado se o meio condicionado pelas superfícies modificadas apresentou efeitos citotóxicos, e os resultados mostraram alta atividade das desidrogenases mitocondriais em todas as superfícies modificadas, apresentando maior número de células viáveis quando comparadas ao controle (Ti) em todos os grupos, principalmente em TiO₂+BSA (**Figura 34b**). Estes resultados sugerem um comportamento metabólico diferencial das células osteoblásticas que interagem com as diferentes superfícies de titânio avaliadas nesse estudo e essa afirmação nos levou a abordar melhor o comportamento molecular destas células.

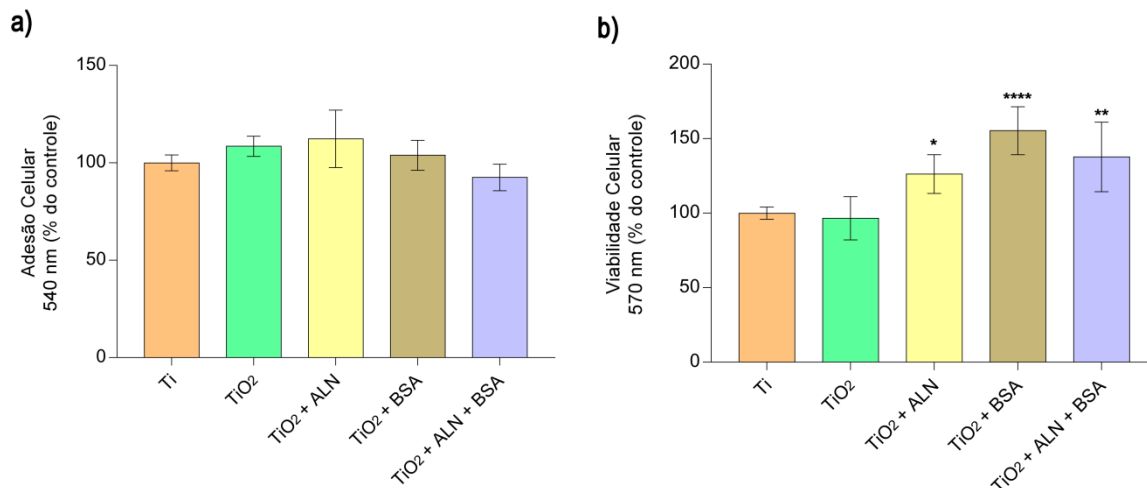


Figura 34. Ensaios de adesão celular por Cristal Violeta **(a)** e ensaio de viabilidade celular por MTT **(b)** nas diferentes superfícies em contato indireto pelo período de 24 horas. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * ($p<0,05$), ** ($p<0,001$) e **** ($p<0,0001$).

Considerando os resultados, é possível observar um repertório de genes relacionados à adesão celular. Primeiramente, a expressão gênica de Integrina- β 1 (**Figura 35a**) foi requerida diferentemente considerando os biomateriais, onde houve uma diminuição significativa na

resposta ao TiO_2 +ALN e, inversamente, aumentou significativamente em resposta ao TiO_2 +BSA e TiO_2 +ALN+BSA. A Integrina possui subunidades (α e β) correlacionadas com a transdução de sinais, conectando-se às proteínas da MEC e outras proteínas de sinalização incluídas nos processos de proliferação e migração celular (AIYELABEGAN; SADRODDINY, 2017). A ativação da Integrina beneficia a interação com outras proteínas-chave envolvidas nessa cascata de sinalização celular, como Fak e Src, que mostraram expressões gênicas significativas nas superfícies remodeladas (MITRA; SCHLAEPFER, 2006; BEZERRA et al., 2017). Assim, as **Figuras 35b** e **33c** mostram um panorama da expressão muito semelhante à Integrina- $\beta 1$. Estes resultados destacam que esses genes são modulados significativamente durante as alterações fenotípicas dessas células, apesar da baixa expressão quando comparados ao controle, certamente pela quantidade considerável de proteína presente.

O rearranjo do citoesqueleto é um evento importante durante a adesão celular, porque também investigamos genes relacionados a essa condição, e a expressão de Cofilina diminuiu significativamente em resposta ao TiO_2 +ALN (**Figura 35e**). Como a atividade de Cofilina é modulada pela fosforilação em Ser03, fica clara a importância de considerar a avaliação de uma fosfatase Ser/Thr, portanto o gene Pp2A também foi investigado aqui e o resultado mostra uma diminuição na atividade desse gene nos osteoblastos que respondem ao TiO_2 +ALN e TiO_2 +BSA (**Figura 35d**). Os osteoblastos respondem diferentemente às superfícies propostas, modificando seu fenótipo, exigindo genes relacionados à adesão celular e rearranjo do citoesqueleto. Além disso, parece um eixo importante de sinalização intracelular que requer Pp2A na modulação da atividade de Cofilina através da desfosforilação transitória de Ser03.

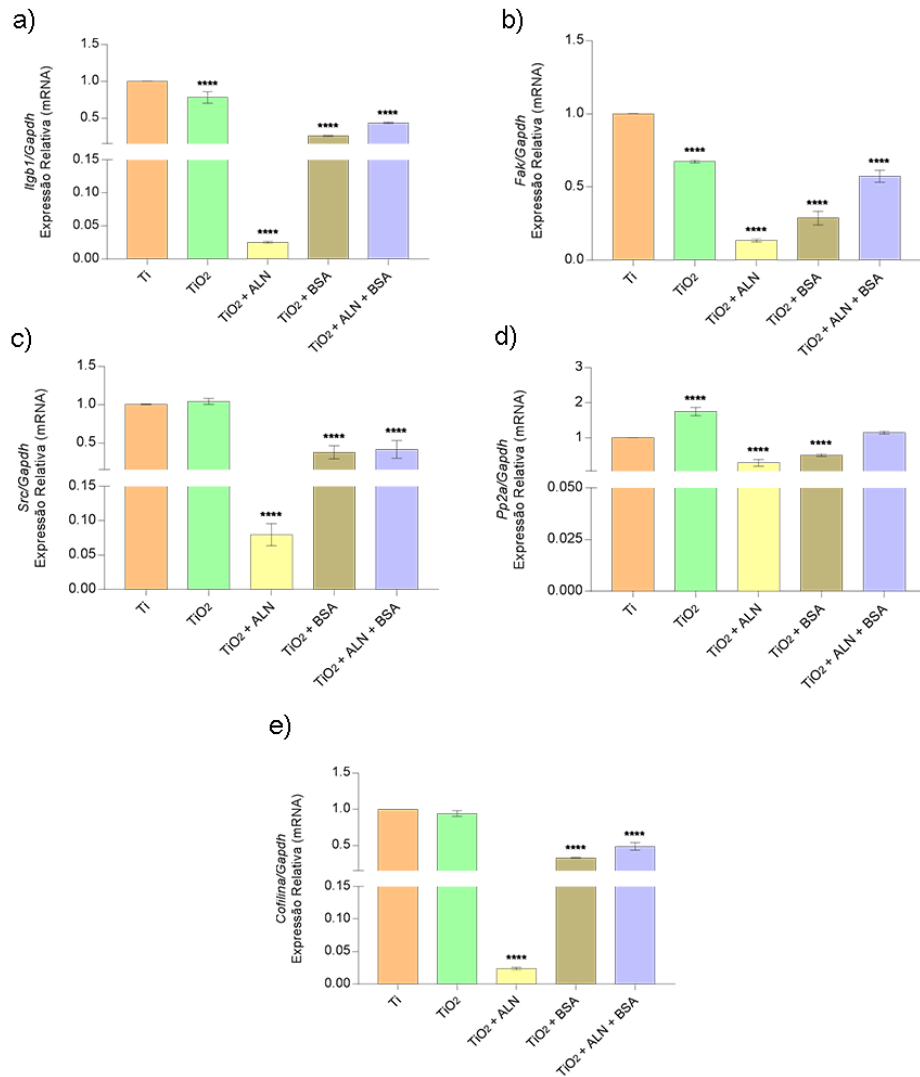


Figura 35. Expressão gênica de genes relacionados à adesão celular: Integrina-β1 **(a)**, Fak **(b)**, Src **(c)**, Pp2A **(d)** e Cofilina **(e)**, em contato indireto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. ** ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$).

O metabolismo envolvido nestas células desafiadas com as diferentes composições de superfícies mostrou um dinamismo importante quanto a variações fenotípicas necessárias a esse processo adaptativo, interferindo significativamente em células responsivas direta e indiretamente, destacando este evento como algo dinâmico ao tecido periimplantar (considerando este material no hospedeiro). Neste sentido, busca-se compreender melhor o comportamento morfológico destas células fazendo uso da tecnologia de Microscopia Óptica Confocal de Fluorescência utilizando uma sonda capaz de identificar fibras de actina, o que nos permite entender mudanças morfológicas decorrentes do rearranjo do citoesqueleto. De

fato, as figuras mostram variações nesses filamentos de actina nos diferentes grupos analisados, corroborando com os achados previamente descritos onde houve variações na expressão de genes como Cofilina e Pp2a, envolvidos na regulação desses processos morfológicos, uma vez que a fosforilação de Cofilina determina sua capacidade de interação com os monômeros e filamentos de actina, e por fim, responsabiliza-se parcialmente às alterações morfológicas de células aderentes. Por ser tratar de adesão celular, plataformas supramoleculares também explicam essa performance na adesão celular como relatado anteriormente mediante comportamentos dos genes Fak e Src. Destarte a importância de Src em processos de adesão, foi destacado também seu já conhecido papel na diferenciação de osteoblastos, promovendo controle importante na osteogênese; onde reflete-se a uma função bifásica desta proteína participando de eventos biológicos capazes de controlar a biologia destas células. A **Figura 36** mostra os requisitos diferenciais para o rearranjo do citoesqueleto pelas superfícies modificadas de Ti.

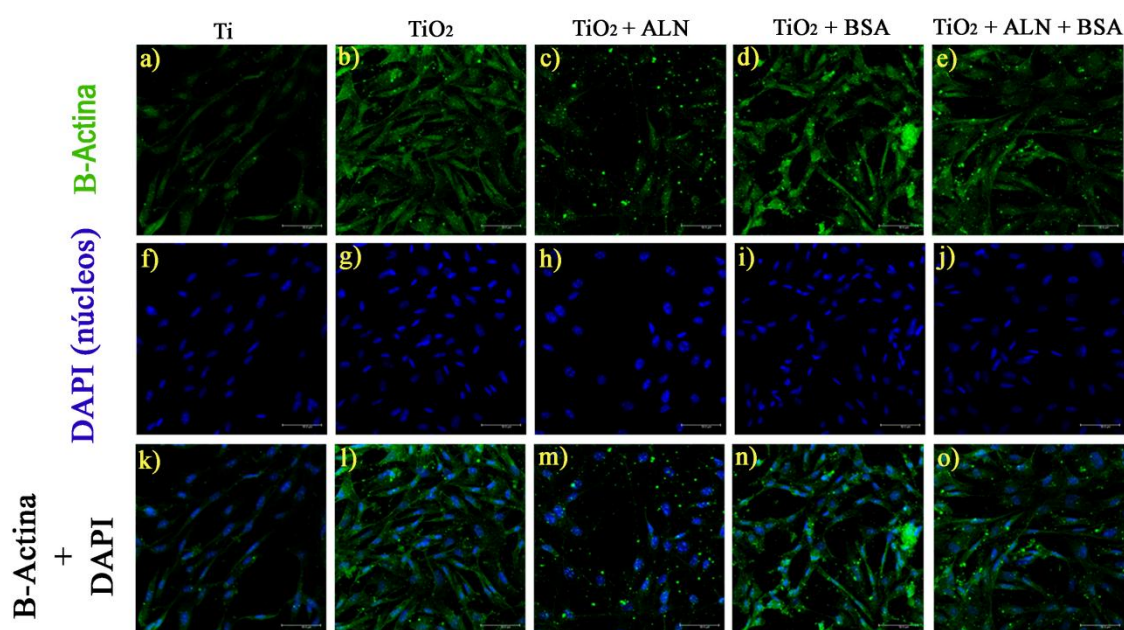


Figura 36. As alterações morfológicas são acompanhadas pelo rearranjo dinâmico do citoesqueleto. Microscopia Óptica Confocal de Fluorescência marcando a proteína B-actina mostra o citoesqueleto das células em Ti (**a, f, k**), TiO₂ (**b, g, l**), TiO₂+ALN (**c, h, m**), TiO₂+BSA (**d, i, n**) e TiO₂+ALN+BSA (**e, j, o**). As barras de escala são 50 µm.

Em seguida, avaliamos os genes relacionados à MEC considerando o comportamento das atividades gênicas e atividades gelatinolíticas das MMPs a partir da técnica de Zimografia. Considerando esse panorama biológico, os resultados mostram um aumento

significativo na expressão do gene Timp2 (**Figura 37a**) em todos os grupos modificados, especialmente em TiO₂+ALN+BSA; enquanto o gene Mmp2 (**Figura 37b**) diminuiu quando comparado ao controle (Ti). Na **Figura 37c**, é possível observar uma superexpressão de Mmp9 para todas as superfícies modificadas, sugerindo um equilíbrio entre Mmp2 e Mmp9 nessas condições. Em seguida, avaliamos a atividade das MMPs a partir da abordagem zimográfica, onde os resultados mostram um aumento significativo de ambas as atividades em resposta ao grupo TiO₂+ALN (**Figura 37d-j**). Neste tópico, sugerimos a remodelação dinâmica da MEC como pré-requisito para eventos de biomineralização tardia, onde o rearranjo da MEC é necessário para a nucleação da hidroxiapatita, o principal constituinte mineral do osso.

A matriz extracelular (MEC) fornece um andaime para as células, principalmente considerando adesão, proliferação e diferenciação, e seu remodelamento é descrito como uma atividade fundamental para o aprimoramento dessas funções (LIU; CHAUDHURI; PAREKH, 2017). As metaloproteinases da matriz (MMPs) são endopeptidases de zinco responsáveis pela regulação de vários mecanismos, incluindo a remodelação do rearranjo da matriz extracelular (MIZUTANI et al., 2001). Durante a diferenciação de osteoblastos, há um controle rigoroso da remodelação extracelular por meio da atividade equilibrada de MMPs e seus inibidores teciduais, Timp2, que mostraram ser dinâmicos em resposta às superfícies. Em particular, o Timp2 desempenha um papel importante na diferenciação osteoblástica e sua expressão modula positivamente a atividade de MMPs, e a expressão de Mmp2 e Mmp9, juntamente com a atividade enzimática, mostram que há uma remodelação da MEC nas diferentes superfícies modificadas, e estes dados foram também mostrados anteriormente (ZAMBUZZI et al., 2009).

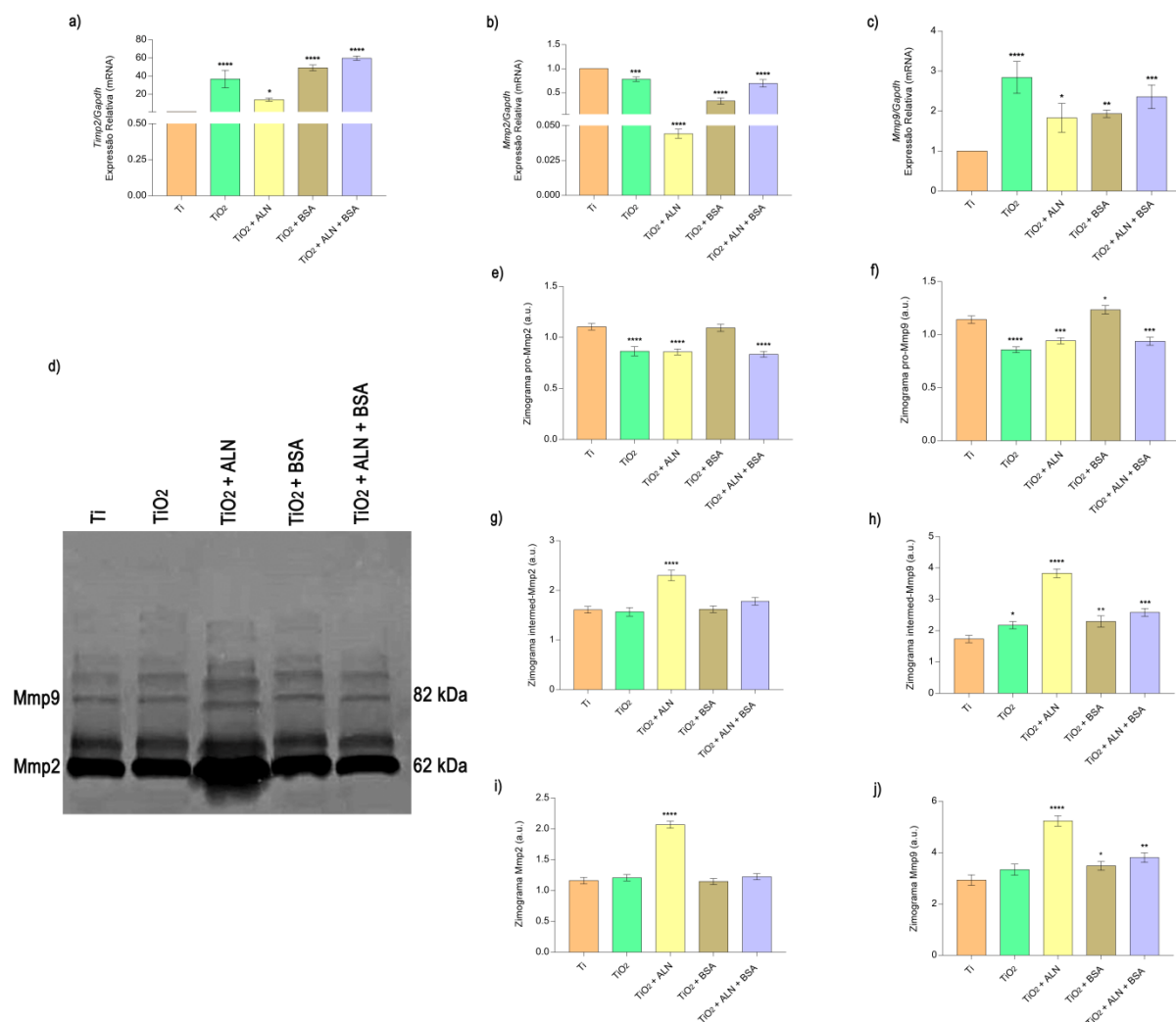


Figura 37. Expressão gênica de genes envolvidos no rearranjo da matriz extracelular: Timp2 (a), Mmp2 (b) e Mmp9 (c), em contato indireto, utilizando a tecnologia q-PCR. As análises para a atividade enzimática das MMPs foram realizadas utilizando a técnica de Zimografia. Degradações da gelatina demonstrada por SDS-PAGE revelaram a faixa de atividade relativa para as gelatinases (d), além das análises estatísticas para as atividades de Mmp2 (e, g, i) e Mmp9 (f, h, j). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$).

Posteriormente, o fenótipo mineralizante dessas células foi avaliado respeitando a análise de biomarcadores da diferenciação osteoblástica, e os genes avaliados foram os mesmos do contato direto (Figura 38). Os resultados mostram que a expressão de Runx2 aumentou cerca de 15 vezes a resposta ao TiO₂+ALN quando comparado ao controle (Figura 38a), sugerindo um forte envolvimento desse tratamento no fenótipo osteoblástico. Um comportamento semelhante em resposta ao TiO₂+ALN (alteração de aproximadamente 3 vezes) também foi observado considerando o gene Alp, gene essencial para eventos de

mineralização óssea (ZAMBUZZI et al., 2014) (**Figura 38b**). O gene *Bsp* está relacionado à deposição de hidroxiapatita na matriz óssea e sua expressão mostra um aumento significativo nas superfícies de TiO_2 +ALN e TiO_2 +ALN+BSA (**Figura 38c**). Outros genes foram mostrados envolvidos nesse processo, como *Spp1* (**Figura 38d**) *Bglap2* (**Figura 38e**). A expressão de *Dmp1*, responsável pela maturação dos osteoblastos (GEORGE; GUIRADO; CHEN, 2018), mostra uma diminuição na resposta ao TiO_2 +ALN considerando esse modelo biológico (**Figura 38f**).

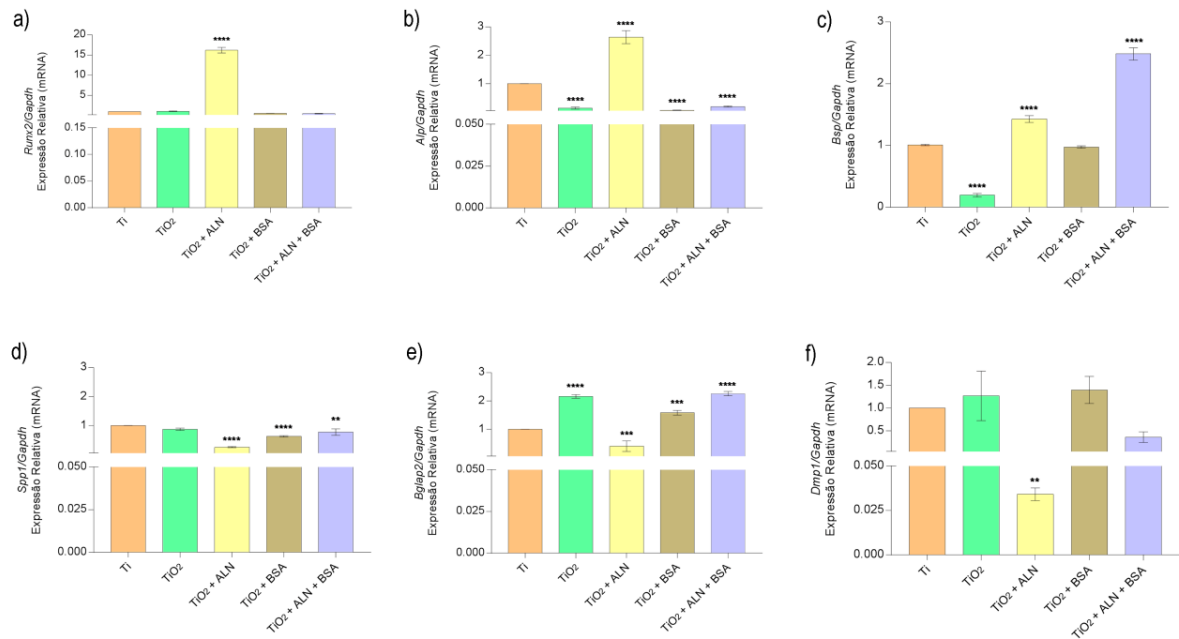


Figura 38. Expressão gênica de genes relacionados à diferenciação celular: *Runx2* (a), *Alp* (b), *Bsp* (c), *Spp1* (d), *Bglap2* (e) e *Dmp1* (f) em contato indireto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. ** ($p < 0,01$) *** e **** ($p < 0,0001$).

4.8 Testes biológicos com fibroblastos (3T3)

4.8.1 Testes em contato direto com as superfícies

Embora os fibroblastos não sejam as células primordiais aos eventos de promoção óssea, sabe-se que estas células contribuem para tais eventos fornecendo fatores tróficos decisivos aos osteoblastos através de uma sinalização parácrina (DA COSTA FERNANDES et al., 2017). Os osteoblastos e fibroblastos se assemelham quanto à origem e função, aproximando-os pelos seus fenótipos, como descrito por Karsenty, nos anos 90, onde seu grupo aponta que uma diferença marcante entre as duas células é a expressão do gene CBFA1 (DUCY et al., 1997). A função dos fibroblastos tem extrema importância com relação aos eventos de osseointegração, também contribuindo com a diferenciação de osteoblastos.

Considerando o papel significativo dos fibroblastos nos processos de reparos teciduais (CHIQUET; KATSAROS; KLETSAS, 2015), é pertinente avaliar o comportamento biológico destas células quando em contato direto com as superfícies de titânio modificadas. A análise de adesão celular na superfície do biomaterial é de extrema relevância para possíveis aplicações na área médica, e esta foi estimada a partir do corante de Cristal Violeta. A **Figura 39a** mostra um aumento do número de células aderidas no grupo TiO_2 +ALN, enquanto uma padronização da adesão celular nas superfícies de TiO_2 , TiO_2 +BSA e TiO_2 +ALN+BSA foi observada. Existem alguns métodos que avaliam a viabilidade celular, e o ensaio colorimétrico de MTT é comumente utilizado em cultura celular para determinar a atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais. Um aumento de células viáveis nas superfícies funcionalizadas com alendronato (TiO_2 +ALN) e albumina (TiO_2 +BSA) é evidenciado na **Figura 39b**.

O processo de adesão da matriz extracelular resulta de diversas interações entre os receptores de membrana plasmática e as proteínas de adesão. Com o intuito de conhecer melhor os mecanismos intracelulares envolvidos com estes eventos, a expressão dos genes Fak e Src, relacionados com a adesão celular, foi avaliada através da tecnologia qPCR. A superfície de TiO_2 , na expressão de Fak, teve um aumento de aproximadamente 7 vezes quando comparada ao controle (Ti), e o mesmo padrão de aumento (6 vezes) foi observado no grupo com albumina (TiO_2 +BSA), como mostra a **Figura 39c**. Os resultados mostram um aumento na expressão do gene Src (**Figura 39d**) também na superfície TiO_2 +BSA, sugerindo assim que a presença de albumina nas superfícies destes materiais possibilitou uma maior interação com a célula.

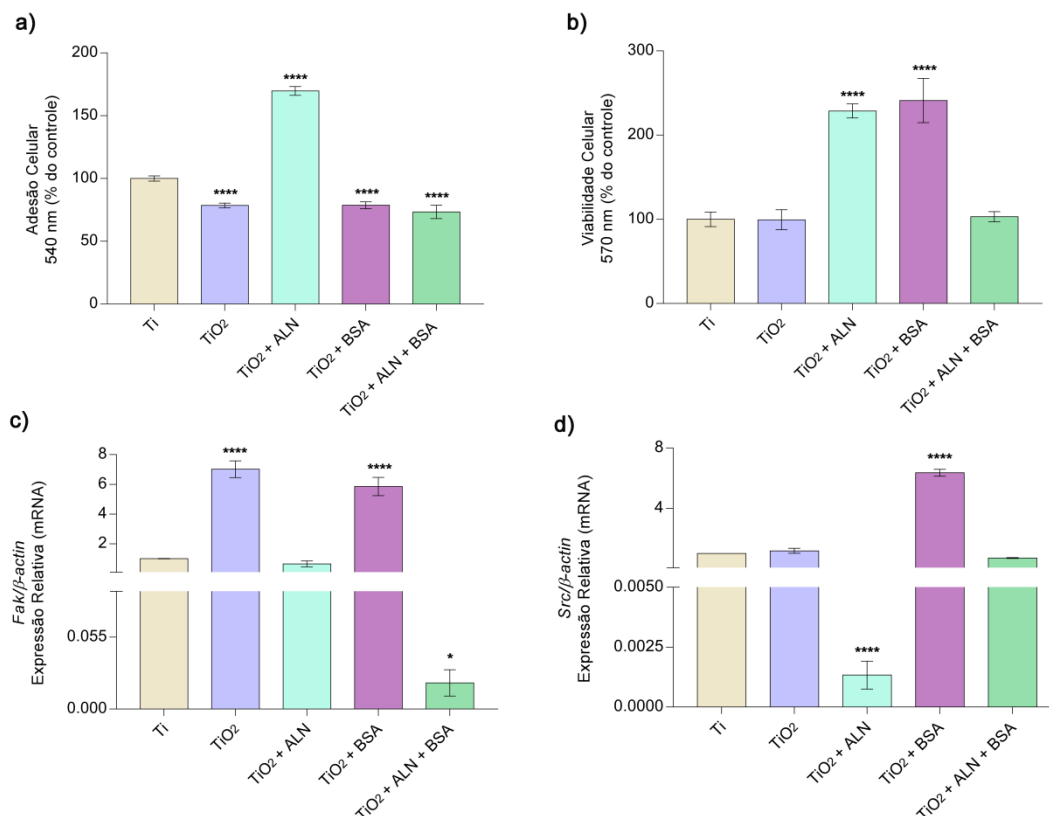


Figura 39. Ensaio de adesão celular por Cristal Violeta **(a)**, ensaio de viabilidade celular por MTT **(b)** e expressão gênica de genes relacionados à adesão celular: Fak **(c)** e Src **(d)**, utilizando a tecnologia q-PCR. Os testes foram realizados em contato direto, com as diferentes superfícies pelo período de 24 horas. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,0001$).

O ciclo celular desenvolve características importantes durante mecanismos de regeneração tecidual, sendo ponto marcante durante o desfecho da população heterogênia de células ali residentes. Trata-se de um mecanismo extremamente controlado por fatores externos, os quais necessitam de respostas imediatas das células, desenvolvidas através de vias de sinalização específicas, tal qual culmina em processos de controle da expressão de genes envolvidos com a progressão do ciclo. Neste cenário, as quinases dependentes de ciclina (CDKs) compõem uma família de proteínas na qual os membros estão comprometidos no controle do ciclo celular. A ativação destas quinases é controlada por ciclinas e a sua inibição é realizada por seus inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDKis) (MALUMBRES; BARBACID, 2005).

Dentre elas, as CDKs 4 e 6 constituem um complexo com a Ciclina D e regulam a progressão da fase G1 e a transição das fases G1-S, enquanto a CDK2 também é responsável

pela transição das fases G1-S, se ligando a Ciclina E. A CDK2 também conduz a progressão da fase S, se unindo a Ciclina A. Existem duas famílias que constituem os inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDKis): a família CIP/KIP e a família INK4, que inclui a proteína p15. O grupo INK4 é responsável pela inibição das CDKs 4 e 6 (MALUMBRES; BARBACID, 2005). Assim, esta breve introdução acerca destes eventos denota ser um evento rigorosamente modulado.

Com o intuito de conhecer o fenótipo das células frente a este processo de proliferação celular, a expressão gênica de P15 é demonstrada na **Figura 40a**, onde todos os grupos foram expressos abaixo do controle (Ti), e o fenótipo proliferativo foi medido avaliando os genes CDK2, CDK4 e CDK6. Os resultados mostraram um aumento na expressão de CDK2 nos grupos TiO₂, TiO₂+BSA e TiO₂+ALN+BSA (**Figura 40b**), enquanto um perfil de expressão semelhante a P15 foi expresso em CDK4 (**Figura 40c**) e CDK6 (**Figura 40d**). Portanto, nesta ocasião, sugere-se que haja um estímulo para progressão do ciclo celular. Como já mencionado, este evento é bastante importante e necessário para o crescimento celular na superfície do material. Vale mencionar também que a proliferação compreende uma fase importante durante os eventos iniciais de reparo e regeneração, sendo que, durante a diferenciação destas células, espera-se que o ciclo celular seja negativamente controlado.

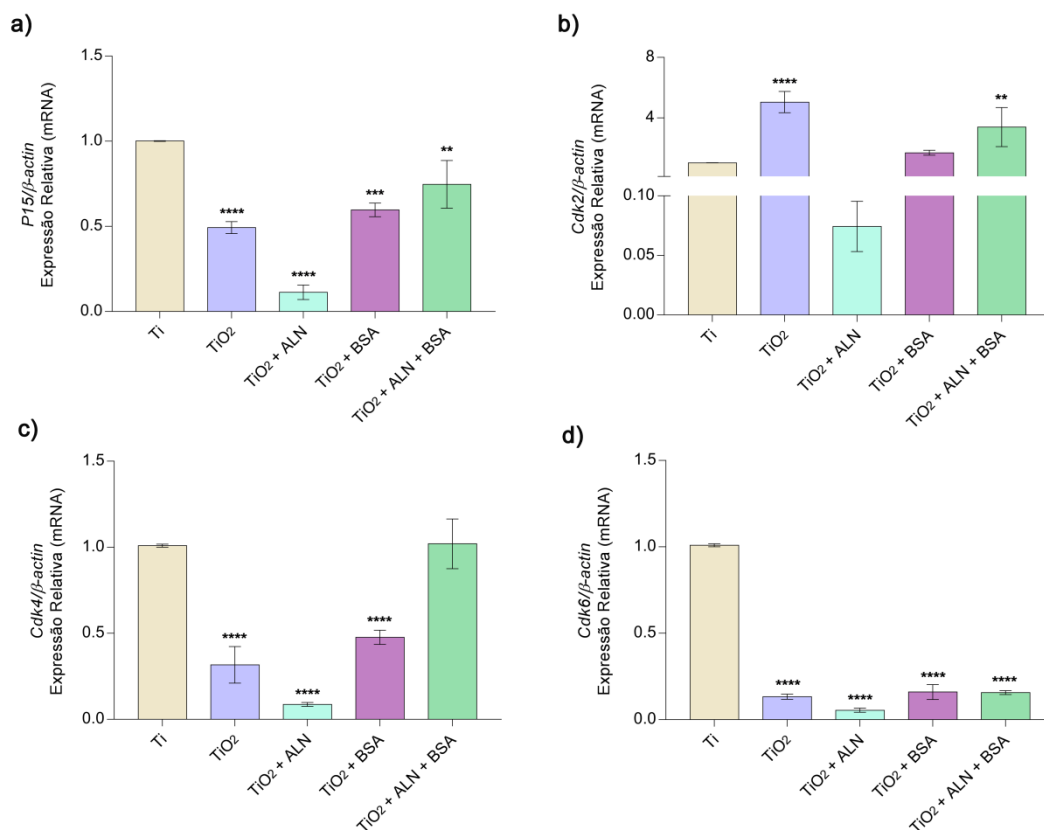


Figura 40. Expressão gênica de genes envolvidos no ciclo celular: P15 **(a)**, Cdk2 **(b)**, Cdk4 **(c)** e Cdk6 **(d)**, em contato direto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. ** ($p < 0,01$) e **** ($p < 0,0001$).

Os fibroblastos apresentam uma função relevante no processo de cicatrização de feridas, que é a produção, remodelamento e degradação de uma nova matriz extracelular (MEC) com a finalidade de reparar os danos causados ao tecido; além de serem responsáveis por sintetizar as metaloproteinases de matriz (MMPs) (CHIQUET; KATSAROS; KLETSAS, 2015; ALMEIDA et al., 2015). As MMPs são responsáveis pela degeneração das proteínas que compõem a matriz extracelular e as membranas basais, e sua atividade é controlada por seus inibidores específicos (Timp) (NAVARRO et al., 2006). Fundamentando-se nisso, os genes relacionados com a matriz extracelular foram considerados, bem como a atividade gelatinolítica a partir da técnica de Zimografia, e os resultados mostraram que houve a necessidade de um remodelamento da matriz desde as 24 horas iniciais. O inibidor Timp1 **(Figura 41a)** apresentou expressões moduladas para baixo quando as superfícies modificadas foram comparadas ao titânio puro (Ti), enquanto Timp2 **(Figura 41b)** exibiu um perfil aumentado principalmente nos grupos TiO₂+BSA e TiO₂+ALN+BSA. A **Figura 41c** mostra

uma superexpressão de Mmp2 em TiO₂ e TiO₂+ALN+BSA (ambas superfícies com aumento de 100 vezes), além da amostra com albumina (TiO₂+BSA) que apresentou um aumento de aproximadamente 125 vezes. Com exceção a resposta do grupo TiO₂+ALN, a expressão de Mmp9 (**Figura 41d**) apresentou-se abaixo em todas as superfícies modificadas quando comparadas ao controle (Ti). A atividade enzimática foi medida pela técnica de Zimografia (**Figura 41e-k**), que evidenciou um aumento das atividades principalmente em Pro-Mmp2 e Mmp2, sendo esse um comportamento semelhante à expressão gênica de Mmp2.

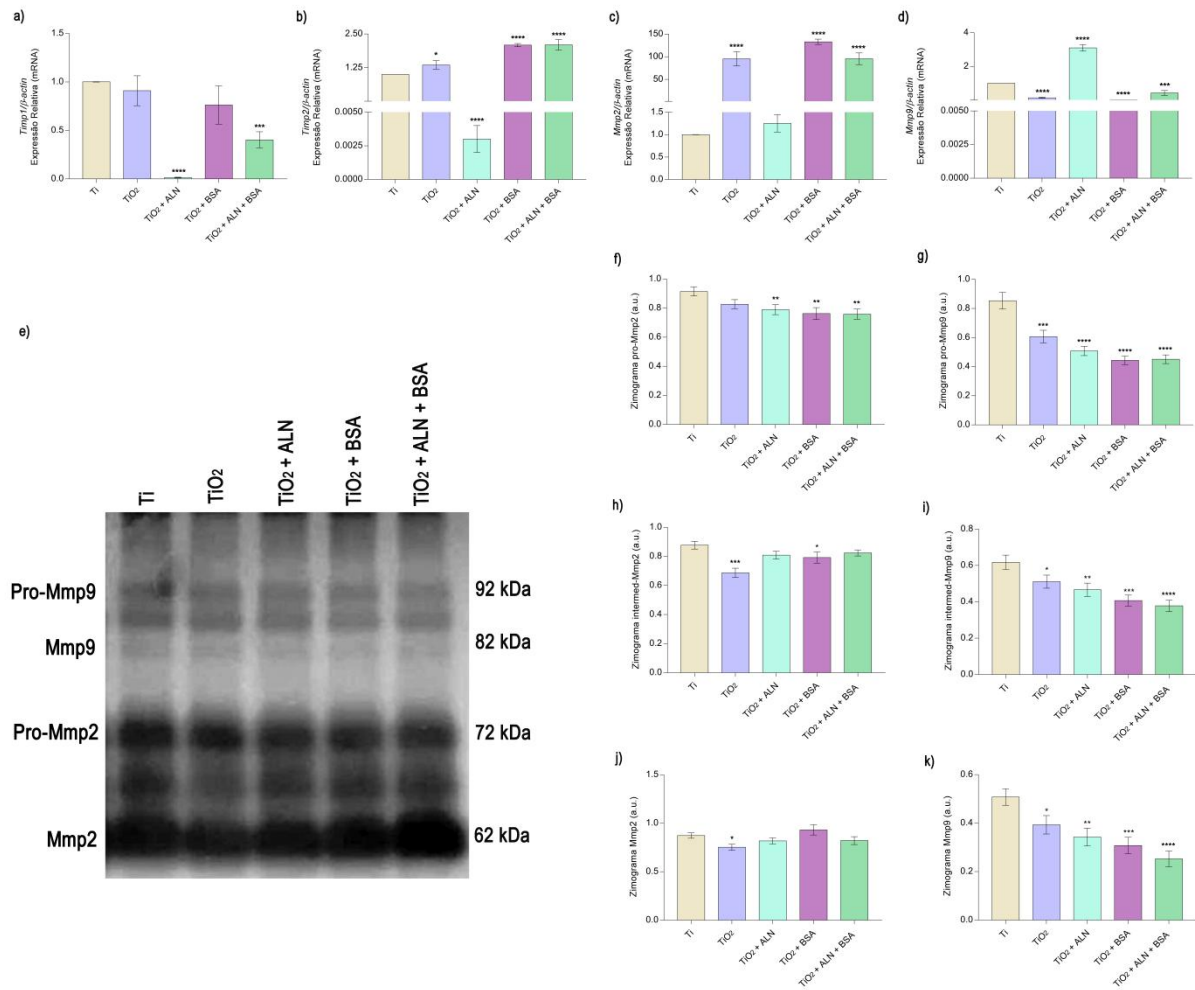


Figura 41. Expressão gênica de genes envolvidos no rearranjo da matriz extracelular: Timp1 (a), Timp2 (b), Mmp2 (c) e Mmp9 (d), em contato direto, utilizando a tecnologia q-PCR. As análises para a atividade enzimática das MMPs foram realizadas utilizando a técnica de Zimografia. Degradações da gelatina demonstrada por SDS-PAGE revelaram a faixa de atividade relativa para as gelatinases (e), além das análises estatísticas para as atividades de Mmp2 (f, h, j) e Mmp9 (g, i, k). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$), *** ($p < 0,0004$) e **** ($p < 0,0001$).

4.8.2 Testes em contato indireto com as superfícies

Após a análise do comportamento de fibroblastos em contato direto com as superfícies de titânio biofuncionalizadas, o contato indireto foi considerado, evidenciando a importância do meio condicionado pelas amostras nos testes de viabilidade e adesão celular de fibroblastos, além de procurar compreender a maquinaria molecular responsável por estas respostas.

Inicialmente, o meio condicionado pelas superfícies foi submetido ao teste de adesão celular a partir do corante de Cristal Violeta, e essa técnica mostrou um aumento crescente no número de células aderidas nos diferentes grupos, como evidenciado na **Figura 42a**. Em seguida, é possível observar os resultados referentes ao teste de viabilidade celular, medido a partir do ensaio de redução de MTT. A **Figura 42b** enfatiza um aumento significativo no número de células viáveis no grupo com albumina (TiO_2 +BSA).

A partir destes resultados, o modelo biológico foi repetido com a finalidade de entender o mecanismo de adesão celular a partir da expressão de dois genes relacionados à adesão, Fak e Src, analisados através da tecnologia qPCR. A **Figura 42c** representa a expressão de Fak, onde as superfícies modificadas com alendronato e albumina apresentaram resultados significativos em comparação ao controle (Ti). A amostra TiO_2 +ALN expressou um aumento de mais de 5 vezes, enquanto a superfície de TiO_2 +BSA mostrou um aumento de aproximadamente 4 vezes, ambas com relação ao titânio puro (Ti). Os dados referentes ao gene Src (**Figura 42d**) apresentaram um comportamento significativo semelhante, onde a amostra de TiO_2 +ALN aumentou cerca de 10 vezes, e a superfície de TiO_2 +BSA exibiu uma superexpressão (cerca de 17 vezes maior); todos em comparação ao controle (Ti).

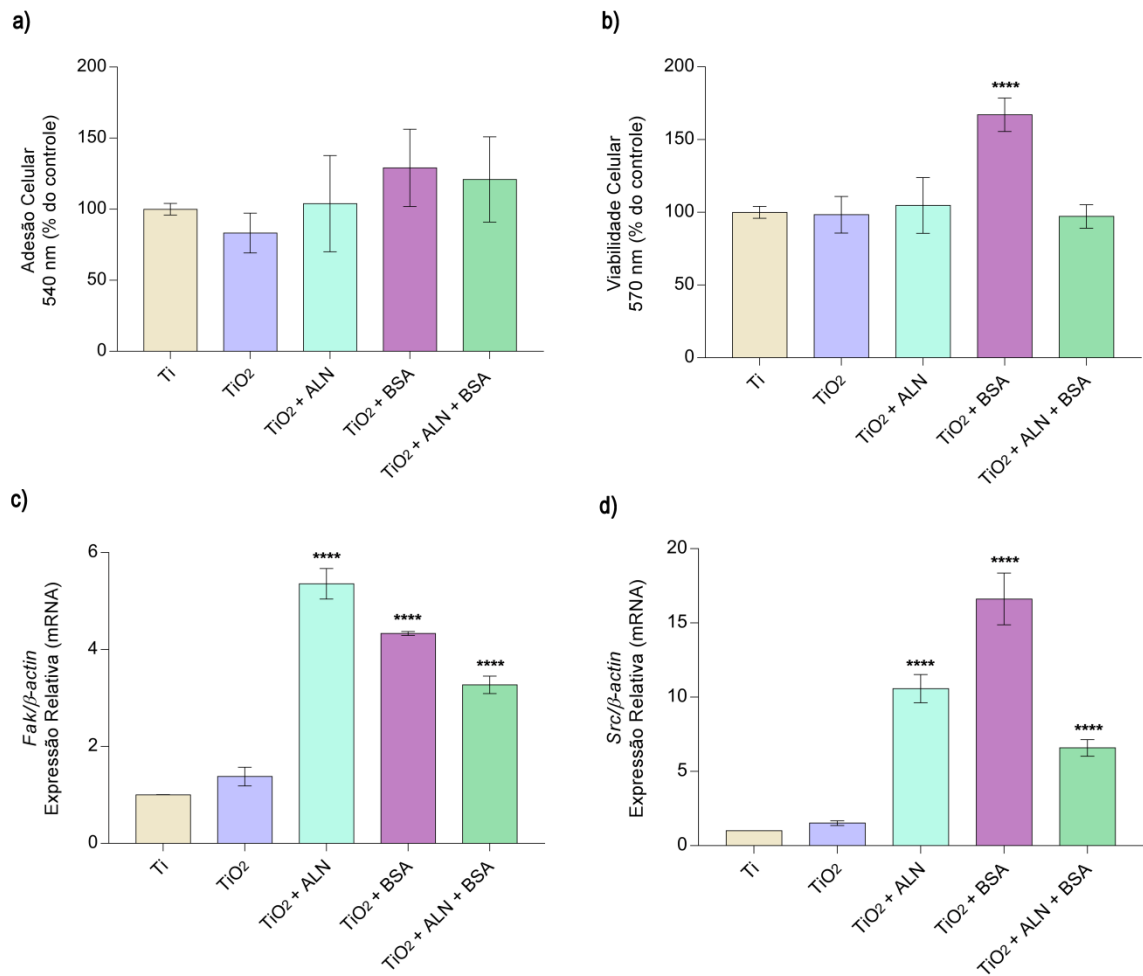


Figura 42. Ensaio de adesão celular por Cristal Violeta **(a)**, ensaio de viabilidade celular por MTT **(b)** e expressão gênica de genes relacionados à adesão celular: Fak **(c)** e Src **(d)**, utilizando a tecnologia q-PCR. Os testes foram realizados em contato indireto, com as diferentes superfícies pelo período de 24 horas. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. **** ($p < 0,0001$).

A **Figura 43**, por sua vez, demonstra uma atividade dinâmica das superfícies propostas em sua condição indireta, embora com dependência do gene CDK2 nas respostas em contato direto, o contato indireto estimula a expressão de CDK6, sugerindo um estímulo integrado ao tecido reacional periimplante, com desfecho, neste momento, para proliferação das células. Sugere-se, também, uma dependência de Src nestes eventos, um protooncogene extremamente habilitado em eventos de contextualização celular, podendo, inclusive, conectar a proliferação celular com os eventos de remodelamento da MEC, como proposto anteriormente (FERNANDES et al., 2018b).

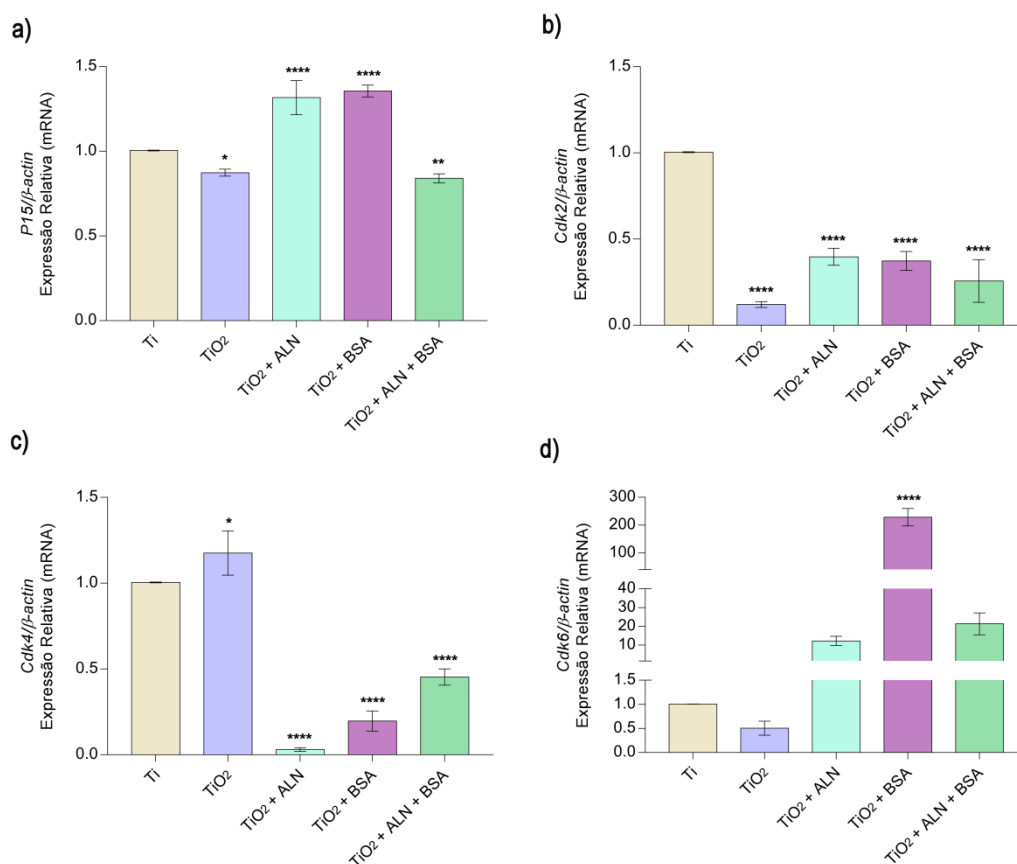


Figura 43. Expressão gênica de genes envolvidos no ciclo celular: P15 (**a**), Cdk2 (**b**), Cdk4 (**c**) e Cdk6 (**d**), em contato indireto, utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * ($p < 0,04$), ** ($p < 0,009$) e **** ($p < 0,0001$).

Como dito anteriormente, pelos fibroblastos possuírem participação efetiva na síntese das metaloproteinases de matriz (MMPs), as expressões das MMPs e seus inibidores teciduais (TIMPs) também foram analisadas quando em contato indireto com as diferentes superfícies. Os inibidores apresentaram expressões significativas e superiores ao controle (Ti), como são observadas na **Figura 44a** a expressão de Timp1, e na **Figura 44b** o perfil de Timp2. As metaloproteinases de matriz apresentaram um perfil de expressão diferente de seus inibidores, a **Figura 44c** mostra um leve aumento na expressão de Mmp2 nos grupos com alendronato e albumina, especialmente em TiO₂+ALN; enquanto a expressão de Mmp9 foi diminuída em todos as superfícies modificadas, como demonstra a **Figura 44d**. Posteriormente, a análise da atividade enzimática foi realizada a partir da técnica de Zimografia (**Figuras 44e-g**), que mostrou um comportamento similar em ambas atividades enzimáticas, tanto de Mmp2 quanto

de Mmp9. Estes resultados sugerem que há um remodelamento da MEC nas diferentes superfícies, devido ao equilíbrio da atividade de Mmps e seus inibidores, Timps.

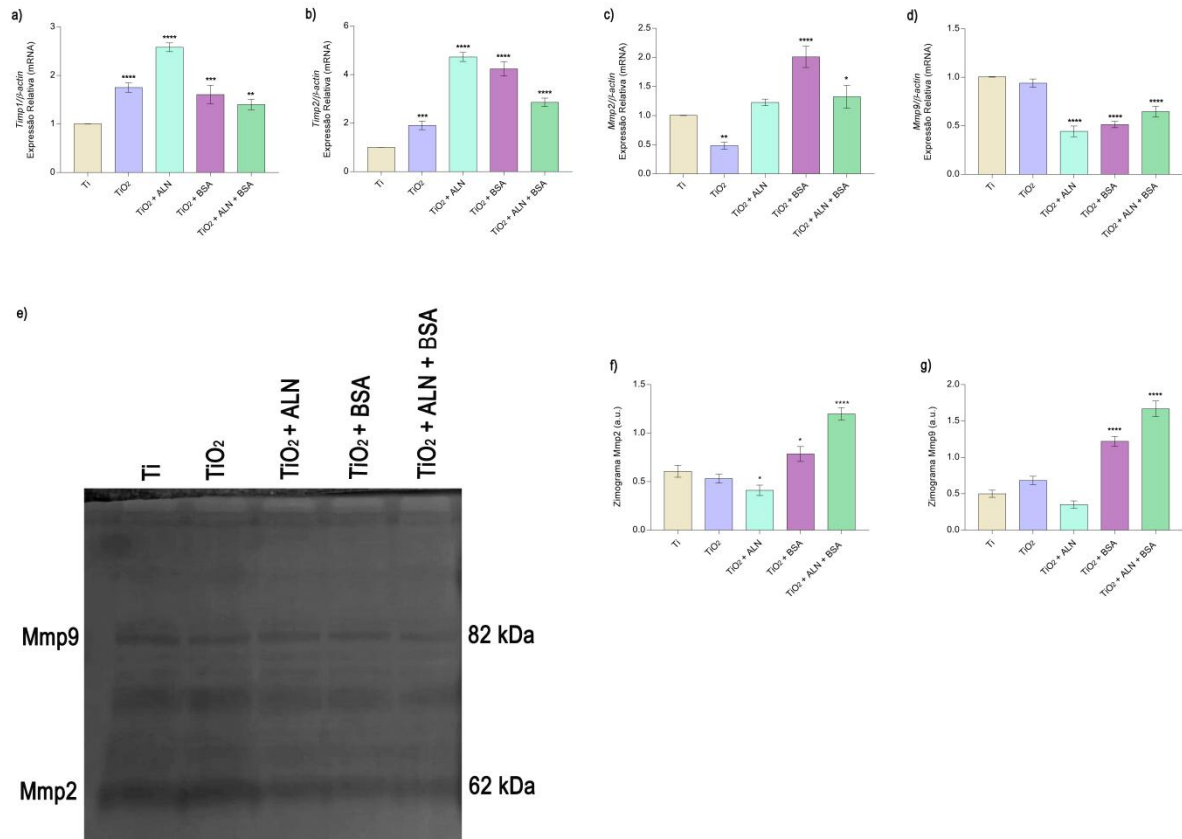


Figura 44. Expressão gênica de genes envolvidos no rearranjo da matriz extracelular: Timp1 (a), Timp2 (b), Mmp2 (c) e Mmp9 (d), em contato indireto, utilizando a tecnologia q-PCR. As análises para a atividade enzimática das MMPs foram realizadas utilizando a técnica de Zimografia. Degradações da gelatina demonstrada por SDS-PAGE revelaram a faixa de atividade relativa para as gelatinases (e), além das análises estatísticas para a atividade de Mmp2 (f) e Mmp9 (g). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle (Ti). One-way ANOVA foi realizado com o teste de Tukey. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,006$), *** ($p < 0,0006$) e **** ($p < 0,0001$).

5. CONCLUSÕES

O estudo realizado nesta dissertação analisou as características físico-químicas e de biocompatibilidade de substratos de Ti Cp4 funcionalizados com TiO₂, Alendronato de Sódio e Albumina de Soro Bovino. O filme fino de TiO₂, depositado de maneira controlada em superfícies de titânio metálico, apresenta uma superfície com grupos hidroxilas, permitindo a fixação de biomoléculas via ligações de hidrogênio e covalente. A deposição do filme pela técnica *spin-coating* no substrato promoveu a formação de nanopartículas de TiO₂ na fase cristalina esperada, rutilo. Com a funcionalização do filme com alendronato e BSA, a mesma foi confirmada pelos espectros de XPS, o qual indicou a presença dos elementos O 1s, C 1s, N 1s e P 2p provenientes das biomoléculas. A rugosidade superficial das amostras foi avaliada e mostrou-se aumentada em todas as superfícies modificadas. Há estudos associando os parâmetros rugosidade e porosidade de superfícies de TiO₂ com resposta celular. A partir da análise de ângulo de contato constatou-se a hidrofiliabilidade nos grupos modificados, evidenciada pelos valores de $\theta < 90^\circ$, e os dados de energia de superfície mostraram a influência de compostos originados da deposição dos compostos.

Os testes biológicos evidenciaram, em contato direto e indireto, uma adequada resposta para a biofuncionalização. A maquinaria molecular responsável por conduzir a viabilidade dos pré-osteoblastos e fibroblastos durante a adesão e viabilidade foi estudada. As análises biológicas indicaram uma melhora significativa na adesão celular, juntamente com a expressão de genes relacionados à adesão (Integrina- β 1, Fak, Src, Pp2A e Cofilina) nas amostras. Para confirmar a adesão, as imagens obtidas por Microscopia Óptica Confocal de Varredura a laser mostraram que os pré-osteoblastos cultivados apresentaram significativo rearranjo dos filamentos de actina, o que poderia estar ocorrendo como evento concomitante à proliferação celular, mostrado pela ativação dinâmica e integrada de CDKs 2 e 6, e Src. Uma vez que o remodelamento da matriz extracelular (MEC) é requerido como um pré-requisito importante para apoiar a adesão de células em superfícies de biomateriais, a atividade de metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) foram avaliados. As MMPs e TIMPs apresentaram resultados significativos na expressão e na avaliação da atividade gelatinolítica das metaloproteinases a partir da análise de Zimografia. Por fim, o comportamento de genes marcadores osteogênicos (Runx2, Alp, Bsp, Spp1, Bglap2 e Dmp1) também foi abordado, e um desempenho positivo das células ósseas foi observado nos grupos com os compostos.

Considerando a estratégia de curto prazo para avaliar a adesão, proliferação e diferenciação celular, é possível observar um importante estímulo osteogênico das superfícies

propostas durante 24 horas. O presente estudo revelou propriedades físico-químicas que estimulam a fixação e crescimento celular nas superfícies de titânio biofuncionalizadas, considerando estratégias *in vitro*. Esses resultados biológicos preliminares *in vitro* exigem abordagens *in vivo* para validar hipóteses para uso em protocolos clínicos e de bioengenharia destas superfícies.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HADY GEPREEL, M.; NIINOMI, M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 20, p. 407–415, abr. 2013.
- ABIMO (Associação Brasileira da Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos, Odontológicos, Hospitalares e de Laboratórios)**. Disponível em: <<https://abimo.org.br/>>. Acesso em: 22 ago. 2019.
- ABTAHI, J.; TENGVALL, P.; ASPENBERG, P. Bisphosphonate coating might improve fixation of dental implants in the maxilla: a pilot study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 39, n. 7, p. 673–677, 1 jul. 2010.
- ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Expression of metalloproteinase 2 in the cell response to porous demineralized bovine bone matrix. **Journal of Molecular Histology**, v. 36, n. 4, p. 311–316, maio 2005.
- AIYELABEGAN, H. T.; SADRODDINY, E. Fundamentals of protein and cell interactions in biomaterials. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 956–970, 1 abr. 2017.
- ALEMANY, L. et al. Morphological and structural characterization of a titanium dioxide system. **Materials Characterization**, v. 44, n. 3, p. 271–275, 1 mar. 2000.
- ALMEIDA, T. et al. Morphological and quantitative study of collagen fibers in healthy and diseased human gingival tissues. **Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie**, v. 56, n. 1, p. 33–40, 2015.
- ALVES, S. A. et al. Tribocorrosion behavior of calcium- and phosphorous- enriched titanium oxide films and study of osteoblast interactions for dental implants. **Journal of Bio- and Tribo- Corrosion**, v. 1, n. 3, p. 1–23, 6 set. 2015.
- AMATO, S. F.; EZZELL, R. M. Regulatory affairs for biomaterials and medical devices. **Woodhead Publishing Series in Biomaterials**, v. 1, 2014.
- ASRI, R. I. M. et al. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: a review. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 77, p. 1261–1274, 1 ago. 2017.

ATAMAN, E. et al. Adsorption of L-cysteine on rutile TiO₂ (110). **Surface Science**, v. 605, n. 1–2, p. 179–186, 1 jan. 2011.

BALER, K. et al. Electrostatic unfolding and interactions of albumin driven by pH changes: A molecular dynamics study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 4, p. 921–930, 30 jan. 2014.

BEZERRA, F. et al. Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface affects pre-osteoblast morphology by modulating critical intracellular pathways. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 8, p. 1888–1898, 2017.

BOURIKAS, K.; KORDULIS, C.; LYCOURGHOTIS, A. Titanium dioxide (anatase and rutile): surface chemistry, liquid–solid interface chemistry, and scientific synthesis of supported catalysts. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 19, p. 9754–9823, 8 out. 2014.

BRONZE-UHLE, E. S. et al. Physicochemical bisphosphonate immobilization on titanium dioxide thin films surface by UV radiation for bio-application. **Surface and Coatings Technology**, v. 357, p. 36–47, 15 jan. 2019a.

BRONZE-UHLE, E. S. et al. Physicochemical characterization of albumin immobilized on different TiO₂ surfaces for use in implant materials. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 564, p. 39–50, 5 mar. 2019b.

BRUNETTE, D. M. et al. Titanium in Medicine. **Springer-Verlag**, 2001.

CAIRES, E. L. P. et al. Tratamento da osteoporose pós-menopáusia: um algoritmo baseado na literatura para uso no sistema público de saúde. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 3, p.254-263, 1 maio 2017.

CARP, O.; HUISMAN, C. L.; RELLER, A. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, n. 1–2, p. 33–177, 1 jan. 2004.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, n. C, p. 153–176, 1 jan. 1994.

CHIQUET, M.; KATSAROS, C.; KLETSAS, D. Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. **Periodontology 2000**, v. 68, n. 1, p. 21–40, jun. 2015.

CORDEIRO, J. M.; BARÃO, V. A. R. Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 1201–1215, 1 fev. 2017.

DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Fibroblast contributes for osteoblastic phenotype in a MAPK-ERK and sonic hedgehog signaling-independent manner. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 436, n. 1–2, p. 111–117, 2017.

DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Zirconia stimulates ECM-remodeling as a prerequisite to pre-osteoblast adhesion/proliferation by possible interference with cellular anchorage. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 4, p. 41, 26 abr. 2018a.

DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Titanium-enriched medium drives low profile of ECM remodeling as a pre-requisite to pre-osteoblast viability and proliferative phenotype. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 339–346, 1 dez. 2018b.

DUCY, P. et al. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 747–754, 30 maio 1997.

EDDY JAI POINERN, G.; BRUNDAVANAM, S.; FAWCETT, D. Biomedical magnesium alloys: a review of material properties, surface modifications and potential as a biodegradable orthopaedic implant. **American Journal of Biomedical Engineering**, v. 2, n. 6, p. 218–240, 7 jan. 2013.

ESEN, E.; LONG, F. Aerobic glycolysis in osteoblasts. **Current Osteoporosis Reports**, v. 12, n. 4, p. 433–438, dez. 2014.

FARRELL, K. B. et al. Bisphosphonate conjugation for bone specific drug targeting. **Bone Reports**, v. 9, p. 47–60, dez. 2018.

FENG, B. et al. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. **Biomaterials**, v. 24, n. 25, p. 4663–4670, 2003.

FERNANDES, C. J. C. et al. CoCr-enriched medium modulates integrin-based downstream signaling and requires a set of inflammatory genes reprogramming *in vitro*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 3, p. 839–849, mar. 2018a.

FERNANDES, C. J. C. et al. Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface creates a biointerface able to govern Src-dependent osteoblast metabolism as prerequisite to ECM

remodeling. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 321–328, 1 mar. 2018b.

FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, mar./abr. 2005.

GEETHA, M. et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 397–425, 1 maio 2009.

GEORGE, A.; GUIRADO, E.; CHEN, Y. DMP1 Binds specifically to Type I Collagen and regulates mineral nucleation and growth. **Biomaterialization**, p. 137–145, 10 out. 2018.

GOMES, O. P. et al. A novel BSA immobilizing manner on modified titanium surface ameliorates osteoblast performance. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 190, 1 jun. 2020.

GUGLIELMOTTI, M. B.; OLMEDO, D. G.; CABRINI, R. L. Research on implants and osseointegration. **Periodontology 2000**, v. 79, n. 1, p. 178–189, 20 fev. 2019.

GUIMARÃES, M. B. et al. Does local delivery of bisphosphonates influence the osseointegration of titanium implants? A systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 11, p. 1429–1436, 1 nov. 2017.

HANAWA, T. A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 41, n. 6, p. 263–272, dez. 2011.

HAYASHI, J. et al. Comparison of adsorption behavior of bovine serum albumin and osteopontin on hydroxyapatite and alumina. **Phosphorus Research Bulletin**, v. 26, p. 23–28, 30 mar. 2012.

HEIM, H.-P. Specialized injection molding techniques. v. 1, 2 nov. 2015.

HENGZHONG, Z.; BANFIELD, J. F. Understanding polymorphic phase transformation behavior during growth of nanocrystalline aggregates: insights from TiO₂. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 15, p. 3481–3487, 2000.

HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química Nova**, v. 18, n. 2, 1995.

HUNKE, H. et al. Low-pressure H₂, NH₃ microwave plasma treatment of polytetrafluoroethylene (PTFE) powders: chemical, thermal and wettability analysis.

Materials, v. 8, n. 5, p. 2258–2275, 28 abr. 2015.

IZQUIERDO, C. DE M.; OLIVEIRA, M. G. DE; WEBER, J. B. B. Terapêutica com bisfosfonatos: implicações no paciente odontológico – revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia - UPF**, v. 16, n. 3, 2011.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A. et al. Recent developments in the detection of bovine serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 602–617, out. 2019.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A.; PANAHI-AZAR, V.; SAJEDI, S. Interaction of glutathione with bovine serum albumin: spectroscopy and molecular docking. **Food Chemistry**, v. 202, p. 426–431, 1 jul. 2016.

KAČIULIS, S. et al. Surface analysis of biocompatible coatings on titanium. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 95, n. 1, p. 61–69, 1 ago. 1998.

KAJITVICHYANUKUL, P.; ANANPATTARACHAI, J.; PONGPOM, S. Sol–gel preparation and properties study of TiO₂ thin film for photocatalytic reduction of chromium (VI) in photocatalysis process. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 6, n. 3–4, p. 352–358, 1 abr. 2005.

KANG, D.-W. et al. Repeated failure of implants at the same site: a retrospective clinical study. **Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 41, n. 1, p. 27, 10 dez. 2019.

KAWASHITA, M. et al. Adsorption characteristics of bovine serum albumin onto alumina with a specific crystalline structure. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 2, p. 453–459, 2 fev. 2014.

KHAN, M. I. et al. Structural, electrical and optical properties of multilayer TiO₂ thin films deposited by sol–gel spin coating. **Results in Physics**, v. 7, p. 1437–1439, 1 jan. 2017.

KOIZUMI, H. et al. Application of titanium and titanium alloys to fixed dental prostheses. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 63, n. 3, p. 266–270, 1 jul. 2019.

KOPAC, T.; BOZGEYIK, K. Effect of surface area enhancement on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 265–271, 1 mar. 2010.

LEFEBVRE, V.; PEETERS-JORIS, C.; VAES, G. Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1094, n. 1, p. 8–18, 13 ago. 1991.

LIU, A. P.; CHAUDHURI, O.; PAREKH, S. H. New advances in probing cell-extracellular matrix interactions. **Integr. Biol. (Camb)**, v. 9, n. 5, p. 383–405, 2017.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

LÜTJERING, G. (GERD); WILLIAMS, J. C. (JAMES C. Titanium. [s.l.] **Springer**, 2007.

MACDONALD, D. E.; RAPUANO, B. E.; SCHNIEPP, H. C. Surface oxide net charge of a titanium alloy: Comparison between effects of treatment with heat or radiofrequency plasma glow discharge. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 173–181, 1 jan. 2011.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 11, p. 630–641, 1 nov. 2005.

MARTINS, M. C. L.; RATNER, B. D.; BARBOSA, M. A. Protein adsorption on mixtures of hydroxyl- and methyl- terminated alkanethiols self-assembled monolayers. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 67A, n. 1, p. 158–171, 1 out. 2003.

MENDES, V. et al. Impact of bisphosphonate therapy on dental implant outcomes: an overview of systematic review evidence. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 48, n. 3, p. 373–381, 1 mar. 2019.

MITRA, S. K.; SCHLAEPFER, D. D. Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, n. 5, p. 516–523, 1 out. 2006.

MIZUTANI, A. et al. Expression of matrix metalloproteinases during ascorbate-induced differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 Cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 11, p. 2043–2049, 1 nov. 2001.

MO; CHING. Electronic and optical properties of three phases of titanium dioxide: Rutile, anatase, and brookite. **Physical Review B, Condensed Matter**, v. 51, n. 19, p. 13023–13032, 15 maio 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MOULDER, J. F. et al. **Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy: a reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.cnyn.unam.mx/~wencel/XPS/MANXPS.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

NAM, S. H.; HYUN, J.-S.; BOO, J.-H. Synthesis of TiO₂ thin films using single molecular precursors by MOCVD method for dye-sensitized solar cells application and study on film growth mechanism. **Materials Research Bulletin**, v. 47, p. 2717–2721, 2012.

NARAYAN, R. et al. Advances in bioceramics and porous ceramics V. **The American Ceramic Society**, v. 33, n. 6, 2012.

NAVARRO, V. P. et al. A participação das metaloproteínas da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 4, p. 233–238, 2006.

NECHIKKATTU, R.; PARK, S. S.; HA, C.-S. Zwitterionic functionalised mesoporous silica nanoparticles for alendronate release. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 279, p. 117–127, maio 2019.

OH, S.-L.; SHIAU, H. J.; REYNOLDS, M. A. Survival of dental implants at sites after implant failure: a systematic review. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 123, n. 1, p. 54–60, 23 abr. 2019.

PARK, E. J. et al. Structural basis of blocking integrin activation and deactivation for anti-inflammation. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 51, 8 jul. 2015.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

RAMAMOORTHY; VANDERBILT; KING-SMITH. First-principles calculations of the energetics of stoichiometric TiO₂ surfaces. **Physical Review B, Condensed Matter**, v. 49, n. 23, p. 16721–16727, 15 jun. 1994.

ROGERS, M. J. et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates.

Cancer, v. 88, n. S12, p. 2961–2978, 15 jun. 2000.

ROSSI, M. C. et al. Titanium-released from dental implant enhances pre-osteoblast adhesion by ROS modulating crucial intracellular pathways. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 105, n. 11, p. 2968–2976, jun. 2017.

RUPP, F. et al. Surface characteristics of dental implants: a review. **Dental Materials**, v. 34, n. 1, p. 40–57, 1 jan. 2018.

SEOP LEE, J.; HOON SHIN, D.; JANG, J. Polypyrrole-coated manganese dioxide with multiscale architectures for ultrahigh capacity energy storage. **Energy & Environmental Science**, 2015.

SHAHNAS BEEGAM, M.; NARENDRANATH, S. B.; PERIYAT, P. Tuning of selective solar photocatalysis by Mn^{2+} decorated nanocrystalline mesoporous TiO_2 . **Solar Energy**, v. 158, p. 774–781, 1 dez. 2017.

SILVA-BERMUDEZ, P.; RODIL, S. E. An overview of protein adsorption on metal oxide coatings for biomedical implants. **Surface and Coatings Technology**, v. 233, p. 147–158, 25 out. 2013.

TRINO, L. D. et al. Surface physicochemical and structural analysis of functionalized titanium dioxide films. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 546, p. 168–178, 5 jun. 2018.

TRINO, L. D. et al. Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 81, p. 26–38, maio 2018.

VETRI, V. et al. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: comparison with human serum albumin. **European Biophysics Journal**, v. 36, n. 7, p. 717–725, 14 ago. 2007.

WANG, L. et al. Surface hydroxylation regulates cellular osteogenesis on TiO_2 and Ta_2O_5 nanorod films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 213–219, 1 jul. 2018.

WANG, X. et al. Visible light photoelectrochemical properties of a hydrogenated TiO_2 nanorod film and its application in the detection of chemical oxygen demand. **RSC Advances**, v. 5, n. 93, p. 76315–76320, 8 set. 2015.

WATTS, N. B.; DIAB, D. L. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 4, p. 1555–1565, 1 abr. 2010.

WERNER, C.; MAITZ, M. F.; SPERLING, C. Current strategies towards hemocompatible coatings. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 32, p. 3376–3384, 8 ago. 2007.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897–5909, 1 out. 2009.

WILLIAMS, D. F. There is no such thing as a biocompatible material. **Biomaterials**, v. 35, n. 38, p. 10009–10014, 1 dez. 2014.

XU, T. et al. Multiple spectroscopic studies on the interaction between olaquinox, a feed additive, and bovine serum albumin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2540–2546, jul. 2012.

YETIM, A. F. Investigation of wear behavior of titanium oxide films, produced by anodic oxidation, on commercially pure titanium in vacuum conditions. **Surface and Coatings Technology**, v. 205, n. 6, p. 1757–1763, 15 dez. 2010.

ZAMBUZZI, W. F. et al. Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 322, n. 1–2, p. 143–150, 7 fev. 2009.

ZAMBUZZI, W. F. et al. Nanometer scale titanium surface texturing are detected by signaling pathways involving transient FAK and Src activations. **PloS One**, v. 9, n. 7, p. e95662, 2014.

ZHANG, D.; YANG, M.; DONG, S. Hydroxylation of rutile TiO₂ (110) surface enhancing its reducing power for photocatalysis. **The Journal of Physical Chemistry C**, p. 1451–1456, 29 dez. 2014.

ZHANG, H. et al. Integrated Ni-P-S nanosheets array as superior electrocatalysts for hydrogen generation. **Green Energy & Environment**, v. 2, n. 2, p. 112–118, 1 abr. 2017.

ZHENG, D.; NEOH, K. G.; KANG, E.-T. Immobilization of alendronate on titanium via its different functional groups and the subsequent effects on cell functions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 487, p. 1–11, 1 fev. 2017.