



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

CAROLINA MARTINELLI BORDIGNON

**EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE NANOESTRUTURADA  
DE TITÂNIO COM RESVERATROL SOBRE A POLARIZAÇÃO DE  
MACRÓFAGOS**

RIBEIRÃO PRETO  
2024

CAROLINA MARTINELLI BORDIGNON

**EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE NANOESTRUTURADA  
DE TITÂNIO COM RESVERATROL SOBRE A POLARIZAÇÃO DE  
MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto,  
como parte dos requisitos para obtenção do Título de  
Mestre em Odontologia, área de concentração  
Implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa M. S. de Castro Raucci

Ribeirão Preto  
2024

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento  
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

BORDIGNON, Carolina Martinelli, 2024-

B729e      Efeito da funcionalização de superfície nanoestruturada de  
titânio com resveratrol sobre a polarização de macrófagos /  
Carolina Martinelli Bordignon . - Ribeirão Preto, 2024.  
59 f. : il. color.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa M. S. de Castro Raucci.

Dissertacao (Mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Odontologia, 2024.

1. Resveratrol. 2. Inflamação. 3. Titânio. 4. Endotoxina. 5.  
Osseointegração. II. Título.

CDD 617.6

**CAROLINA MARTINELLI BORDIGNON**

**“EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE NANOESTRUTURADA  
DE TITÂNIO COM RESVERATROL SOBRE A POLARIZAÇÃO DE  
MACRÓFAGOS”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Odontologia da  
Universidade de Ribeirão Preto para obtenção de  
título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola de  
Castro-Raucci

Área de concentração: Implantodontia

Data de defesa: 30 de outubro de 2024

Resultado: **APROVADA**

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola de Castro-Raucci**

Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade  
de Ribeirão Preto (UNAERP) – Presidente

**Profa. Dra. Erica Alves Gomes**

Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade  
de Ribeirão Preto (UNAERP)

**Profa. Dra. Elizabeth Ferreira Martinez**

Professora Doutora da Faculdade São Leopoldo Mandic (SLMandic)



*Este estudo foi realizado com auxílio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP), processo – 88887.696528/2022-00.*

**Dedico este trabalho à minha eterna amiga,**

**Franciele Pupin.**

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, ***Profa. Dra. Larissa M. S. de Castro Raucci***, por aceitar conduzir este trabalho. Sou grata pela confiança depositada e por toda contribuição de idéias. Suas valiosas indicações fizeram total diferença. Gostaria de expressar minha admiração por sua pessoa, é um privilégio poder aprender com você. Sua maneira especial de partilhar conhecimento torna a jornada extraordinária. Obrigada por sempre acolher minhas considerações e dedicar seu tempo. Foi uma honra poder ser sua orientada. Gratidão!

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, agradeço ao grande **Arquiteto do universo**, que me permitiu viver este período de ensinamento com grande evolução de consciência.*

*Agradeço à minha família, minha base sólida. Em especial à minha mãe **Denise Martinelli Bordignon**, que mesmo vivenciando o luto de meu pai, me concedeu força e incentivo. Nos momentos mais difíceis você foi minha luz. À meu pai, **Luis Eduardo Bordignon** (in memoriam), por ter me ensinado a importância da disciplina, dedicação e por sempre me apoiar em todas as decisões. Aos meus avós maternos, **Ceulo Martinelli** (in memoriam) e **Therezinha de Jesus Badan Martinelli** (in memoriam) pelo amor incondicional, amor este que ultrapassa as fronteiras do espaço tempo, e que me guia até nos dias mais sombrios para ser alguém melhor.*

*À **Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP**, na pessoa de seu Reitor **Prof. Dr. Sebastião Sérgio da Silveira**, obrigada pela oportunidade de poder concretizar este sonho.*

*À Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia **Profa. Dra. Yara Teresinha Correa Silva Sousa**, pelo incentivo, paciência e ensinamentos em todo o curso.*

*Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto: **Prof. Dr. André Pitondo da Silva**, **Prof. Dr. Edson Alfredo**, **Profa. Dra. Érica Alves Gomes**, **Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda**, **Prof. Dr. Fuad Jacob Abi Rached Junior**, **Profa. Dra. Izabela Cristina Mauricio Moris Rivera**, **Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni**, **Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso**, **Prof. Dr. Walter Raucci Neto** e **Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, pela dedicação, atenção, pelos conhecimentos repassados e colaboração à minha formação.*

*Agradeço à minha orientadora **Profa. Dra. Larissa M. S. de Castro Raucci** por toda paciência, dedicação e carinho. Por acreditar em meu potencial, abraçar desafios e sempre fazer isso com imensa alegria e sorriso no rosto. Você é minha inspiração.*

*Ao **Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira**, pela parceria, possibilitando o desenvolvimento do meu trabalho nos Laboratórios de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP-USP).*

*Ao **Prof. Dr. Lucas Novaes Teixeira**, pela ajuda e parceria durante o desenvolvimento do projeto.*

*À **Profa. Dra. Marcelle Danelon** pelos ensinamentos e criação de idéias. Você sempre fez parecer que o sonho mais distante poderia ser alcançado. Obrigada por acreditar em meu potencial.*

*À meu tio avô **Prof. Dr. Celso Martinelli**, você é minha inspiração na profissão, na área acadêmica e na vida. Sua trajetória é motivo de honra para todos nós.*

*À meu tio **Marcelo Martinelli**, por me apresentar a Odontologia, e o amor pela Implantodontia.*

*À meu tio **Ceulo Martinelli filho**, pela paciência e suporte em todos os momentos.*

*Ao doutorando **Antônio Secco Martorano**, pelo apoio no desenvolvimento do projeto, e ensinamentos no laboratório de cultura de células.*

*À minha amiga **Letícia Rabelo dos Santos**, por estar comigo nesse período de mestrado, me fornecendo amizade verdadeira e suporte.*

*À **Arthur Elpidio Quio**, por me motivar a lutar sempre.*

*À minha irmã **Ana Laura Manzano**, pelo apoio incondicional tanto na área profissional quanto na vida. Sem você nada disso seria possível.*

*Aos funcionários da Universidade de Ribeirão Preto, por todo carinho, atenção e ajuda neste período do mestrado.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES-PROSUP**) pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento do projeto.*

*A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.*

"Nada na vida deve ser temido,  
somente compreendido.  
Agora é hora de compreender mais,  
para temer menos."  
**Marie Curie**

## RESUMO

Martinelli-Bordignon CMB. **Efeito da funcionalização de superfície nanoestruturada de titânio com resveratrol sobre a polarização de macrófagos** [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto, 2024. 59p.

O uso de substâncias antioxidantes pode ser uma alternativa interessante para o estabelecimento da homeostase óssea em condições desafiadoras. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da funcionalização de superfícies nanoestruturadas de titânio com resveratrol sobre polarização de macrófagos *in vitro*. Para isso, discos de titânio comercialmente puro foram lixados com lixas d'água gramatura 300, 600 e 1200, lavados em ultrassom e tratados com solução de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  por 2 horas para obtenção de nanotopografia (Ti-Nano). Os discos foram esterilizados e submetidos à funcionalização com concentrações distintas de resveratrol (0, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ), definidas a partir de ensaio prévio de citotoxicidade. Previamente ao plaqueamento, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em três condições distintas: a) M0, de células expostas apenas em meio de crescimento – não polarizadas, b) M1, de células expostas ao meio de crescimento acrescido de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) – polarizadas para o fenótipo pró-inflamatório, ou c) M2, de células cultivadas em meio de crescimento acrescido de interleucina 4 (IL-4) - polarizadas para o fenótipo anti-inflamatório. Após a caracterização fenotípica, as células M0, M1 e M2 foram cultivadas sobre discos de Ti-Nano nas diferentes condições. Foi avaliada a expressão gênica das enzimas arginase 1 (ARG-1) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), dos marcadores de superfície CD-86 e CD-206, e dos marcadores inflamatórios interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6), e do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ). Os dados quantitativos foram avaliados quanto a sua normalidade e homoscedasticidade para a determinação do teste estatístico mais adequado ( $\alpha = 5$ ). Previamente ao plaqueamento, foram identificados maiores níveis de expressão de CD-206 e TGF- $\beta$  em células M2, enquanto macrófagos M1 exibiram maiores níveis de iNOS, IL-1 $\beta$  e IL-6. A expressão de ARG-1 foi maior em M2 e M1, enquanto que a de CD-86 foi superior M0 e M1. Em macrófagos M0, a funcionalização de Ti-Nano com resveratrol modulou positivamente a expressão de CD-206 quando usado a 10  $\mu\text{M}$ , enquanto na concentração de 20  $\mu\text{M}$  houve aumento da expressão de ARG-1 e IL-1 $\beta$ . Em macrófagos M1, o resveratrol a 10  $\mu\text{M}$  reduziu significativamente a expressão de iNOS, CD-86, IL-1 $\beta$  e IL-6, enquanto que a concentração de 20  $\mu\text{M}$  promoveu maiores níveis de CD-86, IL-1 $\beta$  e IL-6. Por outro lado, em macrófagos M2, a exposição ao resveratrol a 10  $\mu\text{M}$  promoveu maiores níveis de iNOS e TGF- $\beta$ , e reduziu níveis de ARG-1 e CD-206; quando utilizado a 20  $\mu\text{M}$ , houve redução de iNOS e aumento de ARG-1. Nesse sentido, os resultados mostraram que os efeitos da funcionalização de Ti-Nano com resveratrol variaram em função das diferentes subpopulações de macrófagos estudadas, sendo a concentração de 10  $\mu\text{M}$  a que se mostrou mais vantajosa por reduzir a expressão de interleucinas pró-inflamatórias e favorecer a expressão de marcadores do fenótipo antiinflamatório em macrófagos M0 e M1. Os resultados desse estudo contribuem para a compreensão dos efeitos de substâncias antioxidantes nos eventos iniciais da interação célula-substrato em implantes de titânio, tanto em condição fisiológica quanto patológica.

**Palavras-chave:** Resveratrol. Titânio. Osteointegração. Endotoxina. Inflamação.

## ABSTRACT

Martinelli-Bordignon CMB. **Effect of functionalizing a nanostructured titanium surface with resveratrol on macrophage polarization** [dissertation]. Ribeirão Preto: University of Ribeirão Preto, 2024. 59p.

The use of antioxidant substances may be an interesting alternative for maintaining bone homeostasis in challenging conditions, such as peri-implantitis. The aim of this study was to evaluate the effects of functionalizing nanostructured titanium surfaces with resveratrol on macrophage polarization in vitro. For this purpose, commercially pure titanium disks were sanded with 600 grit sandpaper, washed in ultrasound and treated with  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  solution for 2 hours to obtain nanotopography (Ti-Nano). The discs were then sterilized and functionalized with different concentrations of resveratrol (0, 10 and 20  $\mu\text{M}$ ), defined on the basis of a previous cytotoxicity test. Prior to plating, RAW 264.7 macrophages were cultured in three different conditions: a) M0, cells exposed only to growth medium - not polarized, b) M1, cells exposed to growth medium plus bacterial lipopolysaccharide (LPS) - polarized for the pro-inflammatory phenotype, or c) M2, cells cultured in growth medium plus interleukin 4 (IL-4) - polarized for the anti-inflammatory phenotype. After phenotypic characterization, M0, M1 and M2 cells were cultured on Ti-Nano discs under different conditions. The gene expression of the enzymes arginase 1 (ARG-1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), the surface markers CD-86 and CD-206, and the inflammatory markers interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) and interleukin 6 (IL-6), and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) were evaluated. The quantitative data was assessed for normality and homoscedasticity to determine the most appropriate statistical test ( $\alpha = 5$ ). Prior to plating, higher levels of CD-206 and TGF- $\beta$  expression were identified in M2 cells, while M1 macrophages exhibited higher levels of iNOS, IL-1 $\beta$  and IL-6. ARG-1 expression was higher in M2 and M1, while CD-86 expression was higher in M0 and M1. In M0 macrophages, the functionalization of Ti-Nano with resveratrol positively modulated the expression of CD-206 when used at 10  $\mu\text{M}$ , while at a concentration of 20  $\mu\text{M}$  there was an increase in the expression of ARG-1 and IL-1 $\beta$ . In M1 macrophages, resveratrol at 10  $\mu\text{M}$  significantly reduced the expression of iNOS, CD-86, IL-1 $\beta$  and IL-6, while the 20  $\mu\text{M}$  concentration promoted higher levels of CD-86, IL-1 $\beta$  and IL-6. On the other hand, in M2 macrophages, exposure to resveratrol at 10  $\mu\text{M}$  promoted higher levels of iNOS and TGF- $\beta$ , and reduced levels of ARG-1 and CD-206; when used at 20  $\mu\text{M}$ , there was a reduction in iNOS and an increase in ARG-1. In this sense, the results showed that the effects of functionalizing Ti-Nano with resveratrol varied according to the different macrophage subpopulations studied, with the concentration of 10  $\mu\text{M}$  proving to be the most advantageous by reducing the expression of pro-inflammatory interleukins and favouring the expression of anti-inflammatory phenotype markers in M0 and M1 macrophages. The results of this study contribute to understanding the effects of antioxidant substances on the initial events of cell-substrate interaction in titanium implants, both in physiological and pathological conditions.

**Keywords:** Resveratrol. Titanium. Osseointegration. Endotoxin. Inflammation.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% – porcentagem  
μL – microlitro  
μm – micrometro  
ALP – fosfatase alcalina  
ARG-1 – arginase  
cm<sup>2</sup> – centímetro quadrado  
CO<sub>2</sub> – gás carbônico  
CD-86 – marcador de superfície  
CD-206 – marcador de superfície  
g – grama  
h – hora  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – ácido sulfúrico  
HCL – ácido clorídrico  
iNOS – enzima óxido nítrico sintase induzida  
IL-1 β – interleucina 1 beta  
IL-4 – interleucina 4  
IL-6 – interleucina 6  
L – litro  
LPS – lipopolissacarídeo  
M – molar  
mg – miligrama  
mg/kg – miligrama por quilograma  
mg/mL – miligrama por mililitro  
min – minuto  
mL – mililitro  
mm – milímetro  
mM – milimolar  
ng/ml – nanograma por mililitro  
nm – nanometro  
NO – óxido nítrico  
°C – grau Celsius  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
pH – potencial hidrogeniônico  
RESV – resveratrol  
RNA – ácido ribonucleico  
ROS – espécies reativas de oxigênio  
s – segundo  
SFB – soro fetal bovino  
T.A. – temperatura ambiente  
TGF- β – fator de crescimento transformador beta  
TNF-α – fator de necrose tumoral  
Ti – titânio  
Ti Nano – titânio com nanotopografia  
Ti Nano+ Resv – titânio funcionalizado com resveratrol  
TiO<sub>2</sub> – dióxido de titânio

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Fluxograma do delineamento experimental.....                                                                                                                           | 21 |
| <b>Figura 2:</b> Representação da sequência para padronização e limpeza dos discos de titânio polidos.....                                                                              | 22 |
| <b>Figura 3:</b> Estrutura química das formas <i>trans</i> -Resveratrol e <i>cis</i> -Resveratrol.....                                                                                  | 24 |
| <b>Figura 4:</b> Valores médios±desvios padrões da viabilidade celular de macrófagos.....                                                                                               | 27 |
| <b>Figura 5:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa de arginase (ARG-1) em macrófagos previamente ao plaqueamento.....                                         | 28 |
| <b>Figura 6:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos previamente ao plaqueamento.....             | 28 |
| <b>Figura 7:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-86 em macrófagos previamente ao plaqueamento.....                             | 29 |
| <b>Figura 8:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-206 em macrófagos previamente ao plaqueamento.....                            | 30 |
| <b>Figura 9:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) em macrófagos previamente ao plaqueamento.....                      | 30 |
| <b>Figura 10:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa de fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) em macrófagos previamente ao plaqueamento..... | 31 |
| <b>Figura 11:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa da interleucina 6 (IL-6) em macrófagos previamente ao plaqueamento.....                                   | 31 |
| <b>Figura 12:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa de arginase (ARG-1) em macrófagos não polarizados (M0).....                                               | 32 |
| <b>Figura 13:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos não polarizados (M0).....                   | 33 |
| <b>Figura 14:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-86 em macrófagos em macrófagos não polarizados (M0).....                     | 33 |
| <b>Figura 15:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-206 em em macrófagos não polarizados (M0).....                               | 34 |
| <b>Figura 16:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) em macrófagos não polarizados (M0).....                            | 35 |
| <b>Figura 17:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa de fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) em macrófagos não polarizados (M0).....        | 35 |
| <b>Figura 18:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa de arginase (ARG-1) em macrófagos polarizados com LPS (M1).....                                           | 36 |
| <b>Figura 19:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos polarizados com LPS (M1).....               | 37 |
| <b>Figura 20:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-86 em macrófagos em macrófagos polarizados com LPS (M1).....                 | 37 |
| <b>Figura 21:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-206 em macrófagos polarizados com LPS (M1).....                              | 38 |
| <b>Figura 22:</b> Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa da                                                                                                        |    |

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) em macrófagos polarizados com LPS (M1).....                                                                                                             | 39 |
| <b>Figura 23:</b> Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa de fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) em macrófagos polarizados com LPS (M1).....  | 39 |
| <b>Figura 24:</b> Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa da interleucina 6 (IL-6) em macrófagos polarizados com LPS (M1).....                                    | 40 |
| <b>Figura 25:</b> Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa de arginase (ARG-1) em macrófagos polarizados com IL-4 (M2).....                                        | 41 |
| <b>Figura 26:</b> Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos polarizados com IL-4 (M2).....            | 41 |
| <b>Figura 27:</b> Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-86 em macrófagos polarizados com IL-4 (M2).....                            | 42 |
| <b>Figura 28:</b> Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-206 em macrófagos polarizados com IL-4 (M2).....                           | 43 |
| <b>Figura 29:</b> Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) em macrófagos polarizados com IL-4 (M2).....                     | 43 |
| <b>Figura 30:</b> Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa de fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) em macrófagos polarizados com IL-4 (M2)..... | 44 |

## TABELA

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Sequência de primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real..... | 26 |
| <b>Tabela 2:</b> Função dos genes utilizados nos ensaios de PCR em tempo real.....     | 26 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                              | <b>16</b> |
| <b>2 PROPOSIÇÃO.....</b>                                                                                                              | <b>20</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....                                                                                                               | 20        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                                                        | 20        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                      | <b>21</b> |
| 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....                                                                                                    | 21        |
| 3.2 OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO.....                                                                                | 22        |
| 3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO RESVERATROL.....                                                                                   | 22        |
| 3.4 FUNCIONALIZAÇÃO COM RESVERATROL.....                                                                                              | 23        |
| 3.5 OBTENÇÃO DA CULTURA CELULAR.....                                                                                                  | 23        |
| 3.6 EXPRESSÃO GÊNICA.....                                                                                                             | 24        |
| 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                                                                                          | 25        |
| <b>4 RESULTADOS.....</b>                                                                                                              | <b>27</b> |
| 4.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES.....                                                                                               | 27        |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS PREVIAMENTE AO<br>PLAQUEAMENTO.....                                                                  | 27        |
| 4.3 EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES<br>NANOESTRUTURADAS DE TITÂNIO COM RESVERATROL SOBRE A<br>POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS..... | 32        |
| 4.3.1 MACRÓFAGOS NÃO POLARIZADOS (M0).....                                                                                            | 32        |
| 4.3.2 MACRÓFAGOS M1.....                                                                                                              | 36        |
| 4.3.3 MACRÓFAGOS M2.....                                                                                                              | 40        |
| <b>5 DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                               | <b>45</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                               | <b>50</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                              | <b>51</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de reabilitação oral obteve avanços significativos com o surgimento dos implantes dentários, culminando no desenvolvimento de novas estratégias que podem proporcionar maior qualidade de vida, estética e conforto aos pacientes. Per-Ingvar Brånemark na década de 1950 em seus estudos de microcirculação, descobriu que o tecido ósseo se fundia com a camada de óxido de titânio do implante, e os dois não poderiam ser separados sem fratura, já que as câmaras feitas de Titânio (Ti) metálico ficavam permanentemente incorporadas no osso (BRANEMARK, 1983). A Academia Americana de Implantodontia (1986) definiu osseointegração como “contato estabelecido sem a interposição de tecido não ósseo entre osso remodelado normal e um implante, acarretando uma transferência sustentada de distribuição de carga do implante para o tecido ósseo” (MENTAG et al., 1986; PANDEY et al., 2022).

Contudo a osseointegração de um implante não é o mesmo que sucesso clínico, pois a perda secundária de osseointegração pode ser um problema frequente em relação a certos biomateriais, bem como aos designs de implantes (ALBREKTSSON, 1993). Quando se trata de implantes dentários, o (Ti) e suas ligas têm sido o biomaterial de eleição. O processo de osseointegração é um tipo confiável de ancoragem óssea (ALBREKTSSON et al., 1981). A taxa e a qualidade da osseointegração em implantes de (Ti) estão relacionadas com as suas propriedades de superfície. A composição da superfície, a hidrofiliabilidade e a rugosidade são parâmetros que podem desempenhar um papel na interação implante-tecido e a liberação local de fármacos estimuladores ou reabsorventes ósseos na região periimplantar pode também responder a situações clínicas difíceis com má qualidade e quantidade de osso (LE GUÉHENNEC et al., 2007).

As características físico-químicas da superfície podem oferecer uma estratégia interessante para alcançar essa capacidade em torno de metais e outros biomateriais implantáveis. Além disso, a funcionalização bioquímica poderá ser um complemento eficaz na funcionalização física (VETRONE et al., 2009; VARIOLA et al., 2011). Diferentes tipos de células respondem à nanotopografia, e as interações célula/matriz/substrato associadas à sinalização celular ocorrem ao nível da nanoescala. Esta sinalização regula adesão, espraiamento, migração, diferenciação e expressão de genes (DUNCAN et al., 1995; DE OLIVEIRA et al., 2004). Estas técnicas, divididas em métodos químicos e físicos, foram selecionadas de acordo com os seguintes parâmetros, necessários para a fabricação em grande escala: (1) capacidade de atingir simultaneamente todas as superfícies em dispositivos com geometrias complexas (por exemplo, hastes femorais, parafusos dentários e stents cardiovasculares); (2) possibilidade de modificar à nanoescala metais e implantes

biocompatíveis disponíveis no mercado; e (3) integração simples na linha de processo industrial (VARIOLA et al., 2011).

As características da superfície modulam os processos de adsorção de água, íons e proteínas, adesão celular e integração de tecidos. Por este motivo, a engenharia e a modificação da superfície são estratégias-chave para controlar o resultado e desenvolver materiais inovadores (THOMAS et al., 2006; REGGIO et al., 2023). (Ti) e suas ligas são biomateriais amplamente utilizados no campo de implantodontia, devido à sua baixa densidade, baixa condutividade térmica, alta resistência à corrosão, capacidade de osseointegração, dureza e principalmente, à sua biocompatibilidade, que é atribuída a formação espontânea de uma camada de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) quando (Ti) é exposto ao oxigênio. Essa reação impede a formação de tecido fibroso em volta do implante, além de criar uma conexão direta com o tecido ósseo (DE JONGE et al., 2008; OLTEAN-DAN et al., 2021). Foram descritas três abordagens para a modificação da superfície de implantes de Ti: métodos físico-químicos, morfológicos e bioquímicos (PULEO et al., 1999). Durante a interação com substratos bi-dimensionais, a célula altera a sua forma e dinamicamente desenvolve extensões chamadas lamelipódios (véus membranares ricos em actina) e filopódios (saliências semelhantes a dedos) que atuam como elementos de detecção e tração para permitir que as células rastejem e percebam pistas topográficas (GIRARD et al., 2007; VARIOLA et al., 2011).

A oxidação controlada de superfícies de titânio e ligas de titânio com uma mistura de  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  gera uma topografia de superfície nanoporosa que promove alguns eventos osteogênicos precoces em culturas de células derivadas de calvária (OLIVEIRA; NANJI, 2004). As características físico-químicas da superfície de titânio tratada com uma solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) são: 1) o tratamento químico cria uma rede esponjosa de nanoporos na superfície do titânio. Essa nanotextura é altamente reprodutível e afeta positivamente a resposta celular, particularmente em processos osteogênicos (formação óssea); 2) o tratamento com  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  aumenta a espessura da camada de  $\text{TiO}_2$  (óxido de titânio) amorfa já existente na superfície, identificado como a principal espécie superficial pela espectroscopia de fotoelétrons por raios X (XPS); 3) a superfície apresenta rugosidade controlada, com valores de RMS (root mean square) variando de 10 a 200 nm em escalas de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , conforme medido por microscopia de força atômica (AFM); 4) a superfície nanotexturizada promove maior adesão celular inicial e acelera a diferenciação de células osteogênicas, evidenciado pelo aumento de proteínas como osteopontina (OPN) e sialoproteína óssea (BSP) na matriz extracelular, além de modular a proliferação celular, aumentando a expressão de genes

relacionados à adesão e migração celular, como integrinas; 5) a remoção de contaminantes superficiais é um benefício adicional do tratamento, sem incorporação significativa de enxofre na superfície, mesmo com o uso do  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 6) o mesmo método pode ser adaptado para criar diferentes morfologias em outras ligas metálicas relevantes para implantes médicos. Essas características fazem desse tratamento uma estratégia eficaz para modificar superfícies de titânio, melhorando a biocompatibilidade e funcionalidade em aplicações biomédicas, como implantes dentários e ortopédicos (VETRONE et al., 2009).

A funcionalização de superfícies de biomateriais com moléculas bioativas é considerada uma estratégia promissora quando se pretende obter efeitos biológicos específicos a nível celular e/ou tecidual (ZUARDI et al., 2023). A funcionalização da superfície com biomoléculas é capaz de favorecer a atividade osteogênica (SOUZA et al., 2019), levando em consideração a característica da superfície de (Ti), os parâmetros do processo de funcionalização e a seleção da biomolécula para a funcionalização (SCANNAVINO et al., 2022).

Após o processo cirúrgico, a interação entre o implante e o tecido lesionado pós-operatório produzirá uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam a agregação de macrófagos e inflamação aguda (YANG et al., 2013; YANG et al., 2021). A inflamação é um conjunto complexo de interações entre fatores solúveis e células que podem surgir em qualquer tecido em resposta a lesões traumáticas, infecciosas, pós-isquêmicas, tóxicas ou autoimunes. O processo normalmente leva à desinfecção e à cicatrização. No entanto, se a destruição direcionada e o reparo assistido não forem adequadamente faseados, a inflamação pode levar a danos persistentes nos tecidos (NATHAN et al., 2002). Os macrófagos são as primeiras células imunitárias que entram em contato com a superfície do implante e desempenham um papel essencial na imunidade inata e na cicatrização de feridas (KARTIKASARI et al., 2022). A resposta imune inata é, de fato, a resposta inflamatória precoce e resolutiva observada nas primeiras duas semanas após a implantação de um dispositivo médico ou biomaterial (ANDERSON, 2016). Os macrófagos apresentam uma vasta gama de receptores de membrana que reconhecem tanto os ligantes derivados do hospedeiro como os ligantes estranhos. A ativação destes receptores pode resultar numa resposta pró-inflamatória, levando ao recrutamento e ativação de outras células imunitárias, ou numa resposta anti-inflamatória na qual a reação imunitária é atenuada e se promove a regeneração dos tecidos e a cicatrização de feridas (NIELSEN et al., 2020).

Macrófagos e osteoclastos compartilham um caminho de desenvolvimento comum e têm a capacidade de se originar a partir de monócitos. O estado de polarização dos

macrófagos afeta a sua capacidade de se diferenciar em osteoclastos, bem como de produzir citocinas e mediadores pró-inflamatórios. (MADEL et al., 2019; KARTIKASARI et al., 2022). As evidências de estudos diferentes *in vitro* e *in vivo* indicaram que o fenótipo M1 dos macrófagos estava associado à destruição óssea e o fenótipo M2 com a cicatrização e reparação óssea (WANG et al., 2019).

Algumas substâncias são estudadas visando ampliar os efeitos benéficos na reparação peri-implantar por meio da modulação da atividade celular, como é o caso do resveratrol (trans-3,4,5-trihidroxistilbeno), um polifenol natural estilbenoide. Foi isolado pela primeira vez em 1939 a partir de raízes de uma planta medicinal venenosa: o lírio heléboro-branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) (TAKAOKA, 1939) e consiste em uma substância ativa derivada de plantas e alimentos com inúmeras propriedades biológicas (LIU et al., 2015), incluindo o impacto inibitório na diferenciação osteoclastica e com potencial para melhorar a formação óssea (CORRÊA et al., 2021).

Além disso, o resveratrol inibe a ciclo-oxigenase, enzima chave na formação da resposta inflamatória (BAVARESCO et al., 2012). Os efeitos do resveratrol têm sido documentado em grande variedade de células, incluindo macrófagos, células polimorfonucleares, plaquetas, osteoblastos, neurônios e células supra-renais (PERVAIZ et al., 2003). O resveratrol é útil para a modulação farmacológica da produção de ROS pelos granulócitos e monócitos ativados na fase inicial da inflamação, em concentrações relevantes é capaz de diminuir a resposta inflamatória (BIGLAGLI et al., 2017).

Alguns fitoestrogênios podem melhorar a formação óssea, aumentar a densidade mineral óssea e aumentar a expressão de marcadores ósseos, incluindo a fosfatase alcalina, a osteocalcina, a osteopontina e o colagênio de tipo I (CHIANG et al., 2013). Um dos primeiros estudos sobre a ação do resveratrol nas células ósseas foi realizado com células osteoblásticas MC3T3-E1. Este estudo demonstrou a capacidade do resveratrol para estimular diretamente a proliferação e a diferenciação de osteoblastos. (MIZUTANI, 1998). O resveratrol aumentou de forma dose dependente, a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de RNA. Por conseguinte, estimulou a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos. Além disso, acelerou a atividade da prolil hidroxilase, indicando aumento na atividade de síntese de colágeno (MIZUTANI, 1998).

Resultados *in vitro* e modelos animais indicam que o resveratrol pode atenuar a osteoclastogênese e promover a osteoblastogênese, sugerindo as suas potenciais aplicações terapêuticas para o tratamento de doenças ósseas, também em virtude da sua baixa toxicidade (MOBASHERI et al., 2013; ALLOISIO et al., 2021). Nesse sentido, seria interessante avaliar os efeitos do resveratrol sobre o processo inflamatório.

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito da funcionalização com resveratrol em superfície nanoestruturada de (Ti) sobre a polarização macrofágica.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Estabelecer a concentração de resveratrol a ser utilizada para a funcionalização dos discos de titânio, por meio de ensaio de citotoxicidade em culturas da linhagem RAW 264.7.

2.1.2 Determinar o perfil de expressão de marcadores-chave da polarização macrofágica e da inflamação em macrófagos não polarizados (M0), macrófagos expostos ao LPS, pró-inflamatórios (M1) ou de macrófagos expostos à interleucina 4, antiinflamatórios (M2).

2.1.3 Avaliar o potencial da funcionalização com resveratrol (0, 10 e 20  $\mu$ M) em superfícies nanoestruturadas de titânio a partir da análise da expressão de marcadores-chave da polarização macrofágica e da inflamação em macrófagos M0.

2.1.4 Verificar os efeitos da funcionalização com resveratrol (0, 10 e 20  $\mu$ M) em superfícies nanoestruturadas de titânio sobre a expressão de marcadores-chave da polarização macrofágica e da inflamação em macrófagos M1.

2.1.5 Analisar os efeitos da funcionalização com resveratrol (0, 10 e 20  $\mu$ M) em superfícies nanoestruturadas de titânio sobre a expressão de marcadores-chave da polarização macrofágica e da inflamação em macrófagos M2.

A hipótese nula deste estudo é a de que a funcionalização de superfícies de titânio nanoestruturadas com resveratrol não interfere na polarização de macrófagos.

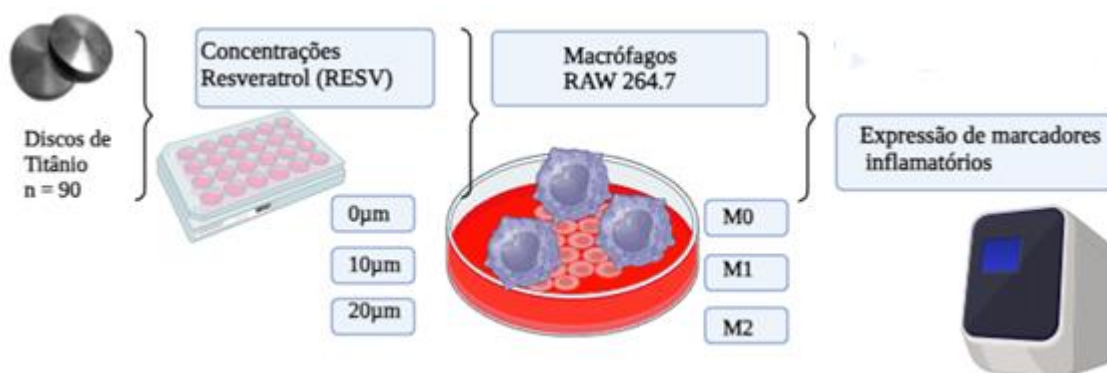
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Esta investigação foi conduzida usando um modelo *in vitro*, com o objetivo de simular a interação do implante com macrófagos após sua instalação. As células foram cultivadas diretamente sobre superfícies nanoestruturadas de titânio funcionalizadas com resveratrol. O fator em estudo foi o tratamento com diferentes concentrações de resveratrol. A variável de resposta foi a expressão de marcadores inflamatórios em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (Figura 1).

O cálculo amostral foi realizado utilizando o software GPower versão 3.1 (FAUL et al., 2007), sendo observado que para as análises seriam necessários, no mínimo, quatro amostras por grupo, para obter 84,04% de nível de poder da análise, considerando 0,05 de erro do tipo  $\alpha$  e tamanho do efeito de 0,96.

**Figura 1.** Fluxograma do delineamento experimental



Fonte: autor

#### 3.2 OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO

Discos de (Ti) de doze mm de diâmetro e dois mm de espessura comercialmente puros (cpTi) foram obtidos a partir de cilindros de titânio (Realum Industria e Comercio de Metais Puros e Liga, São Paulo, SP, BR), por meio de usinagem. A rugosidade superficial dos discos foi padronizada por meio de polimento manual utilizando lixas d'água gramatura 300, 600 e 1200 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, BR). Os discos foram lavados uma vez em ultrassom com acetona e duas

vezes com água deionizada, e, em seguida, foram tratados com uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:1, Merck, Brasil) por 2 horas para obtenção da nanotopografia. A esterilização foi feita por radiação gama no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN, São Paulo, SP), visto que o processo de esterilização com radiação gama preserva a superfície dos discos. A Representação gráfica dos procedimentos para obtenção dos discos encontra-se na Figura 2. As características da superfície de titânio tratada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  incluem uma rede esponjosa de nanoporos altamente reprodutível, com rugosidade controlada (valores RMS entre 10 e 200 nm em escalas de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ), e uma camada de óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) predominantemente amorfa, com espessura aumentada e ausência de fases cristalinas, como rutilo ou anatase. O tratamento remove contaminantes sem incorporar elementos indesejados, como enxofre, e otimiza a superfície para promover adesão celular, diferenciação osteogênica e retenção de proteínas da matriz extracelular, tornando-o ideal para aplicações biomédicas em implantes (VETRONE et al., 2009).

**Figura 2.** Representação da sequência para padronização e limpeza dos discos de titânio polidos (a) obtenção dos discos (b) padronização da rugosidade superficial por meio de polimento manual (c) limpeza em cuba ultrassônica (d) tratamento com solução de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  por 2 horas para obtenção de nanotopografia e) esterilização em radiação gama.



Fonte: autor

### 3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO RESVERATROL

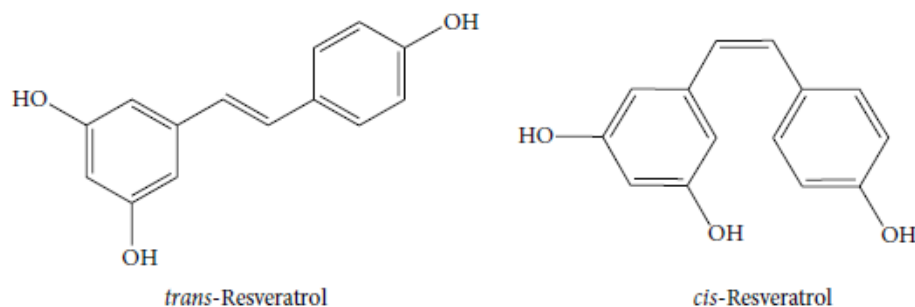
Células da linhagem RAW 264.7 foram cultivadas em meio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) e 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram incubadas a 37°C em

atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem 80% de confluência. O resveratrol (R5010 – Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) para preparo da solução estoque, na concentra final de 1 mM. A partir desta, foram preparadas as seguintes concentrações finais de trabalho em meio D-MEM: 0; 5; 10; 20 e 25 µM. As células RAW 264.7 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3.500 células/poço. Após 24 horas, o meio foi removido e substituído pelo meio D-MEM 10% contendo as diferentes concentrações de resveratrol. As células foram novamente incubadas com as diferentes concentrações por mais 24 horas. Ao final de 24 horas de exposição, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução de um corante redox (resazurina). O ensaio é baseado na capacidade das células vivas de converter a resazurina em um produto final colorimétrico (resorufina), onde aquelas não viáveis perdem a capacidade metabólica e, portanto, não geram um sinal observável e para isso, utilizou-se o reagente alamarBlue™ Cell Viability (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, 10 µL do reagente foram diluídos em 90 µL de meio de cultura suplementado e os 100 µL foram despejados em cada poço, seguido por incubação de 3 horas a 37°C. Após decorrido período, o sobrenadante formado foi medido por análise colorimétrica em espectrofotômetro (570-600nm, Epoch 2, BioTekInstruments Inc., Winooski, VT, USA).

### 3.4 FUNCIONALIZAÇÃO COM RESVERATROL

O procedimento de funcionalização dos discos de (Ti) com resveratrol foi realizado a partir do recobrimento da superfície do disco com três concentrações distintas (0 µM, 10µM, 20 µM) diluídas em uma solução TRIS/HCl com pH = 7,4, produzida a partir de 39 mL/L de HCl e 6,188 g/L de Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS — Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para água ultrapura MilliQ, nesta ordem, conforme protocolo descrito por Reggio et al (2023). A superfície dos discos foram expostas a 200µL de cada solução e armazenados em incubadora a 37°C por 2 horas. Após esse recobrimento, os discos foram secos em fluxo laminar previamente ao cultivo celular. A estrutura química da forma *trans*-Resveratrol foi usada neste estudo, sua representação gráfica encontra-se na figura 3.

**Figura 3:** Estrutura química das formas *trans*-Resveratrol e *cis*-Resveratrol.



Fonte: Gambini et al. (2015).

### 3.5 OBTENÇÃO DA CULTURA CELULAR

Para esse estudo, foram utilizados macrófagos da linhagem celular imortalizada RAW 264.7 (5ª passagem - *American Type Cell Collection*, ATCC). As células foram descongeladas e transferidas para três garrafas estéreis de cultivo celular com 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Biosystem, Brasil) contendo meio de crescimento, composto por DMEM (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) já aquecido a 37°C, suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB), 100U/ml penicilina e 100µg/ml de estreptomicina. Em seguida as células foram levadas à incubadora a uma temperatura de 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico até atingirem subconfluência. Posteriormente o meio de cultura foi removido e cada garrafa recebeu um novo meio de cultura: a) M0, em que as células foram mantidas com meio de crescimento; b) M1, em que as células receberam meio de crescimento acrescido de LPS (200 ng/mL; *E. coli*; Sigma-Aldrich); e c) M2, no qual as células receberam meio de crescimento acrescido de IL-4 (40 ng/mL; Sigma-Aldrich). Após o período de polarização, as células foram removidas com auxílio de um raspador (*cell scraper*, Corning), contadas e plaqueadas sobre os diferentes discos de titânio, contidos em placas de 24 poços, na densidade de 30.000 células/poço. As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C em CO<sub>2</sub> a 5%. Parte das células M0, M1 e M2 obtidas das garrafas foi utilizada para a caracterização fenotípica das diferentes populações celulares baseada na expressão gênica.

### 3.6 EXPRESSÃO GÊNICA

Após 48 horas de cultura celular, o meio de cultura foi removido dos poços, e o reagente Trizol LS (Invitrogen) foi adicionado à temperatura ambiente por 5 minutos, com homogeneização por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada através do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) em espectrofotômetro (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA). A fita de cDNA foi confeccionada a partir de 1 µg de RNA total. Este procedimento foi feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para a reação de PCR em tempo real, foram utilizados o reagente SYBR™ Green PCR Master Mix (ThermoFisher) e o aparelho StepOne Plus (ThermoFisher). As reações foram realizadas em quadruplicata com volume final de 10 µL, contendo 12,5 ng de cDNA. As reações de amplificação consistiram em 2 min a 95°C e quarenta ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60 °C. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold, ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene constitutivo β-actina. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par de *primers* avaliados. O método comparativo de  $2^{-ddCt}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado para comparar a expressão gênica das culturas dos diferentes grupos experimentais. As sequências dos *primers* selecionados para este estudo estão dispostos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sequência de primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real

| Gene         | <i>Foward</i>         | <i>Reverse</i>          |
|--------------|-----------------------|-------------------------|
| <b>CD86</b>  | TGTTTCCGTGGAGACGCAAG  | TTGAGCCTTTGTAAATGGGCA   |
| <b>CD206</b> | CTCTGTTCAGCTATTGGACGC | CGGAATTTCTGGGATTGAGCTTC |

|                               |                               |                             |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <b>ARG-1</b>                  | CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG        | AGGAGCTGTCATTAGGGACATC      |
| <b>iNOS</b>                   | GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA       | GTGGACGGGTCGATGTCAC         |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> | GCT ACC TGT GTC TTT CCC GT    | CAT CTC GGA GCC TGT AGT GC  |
| <b>IL-6</b>                   | CAA TGG CAA TTC TGA TTG TAT G | AGG ACT CTG GCT TTG TCT TTC |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | ACGTCAGACATTCGGGAAGC          | GGTAACGCCAGGAATTGTTGC       |
| <b>ACT</b>                    | CTCTGGCTCCTAGCACCATGAAGA      | GTAAAACGCAGCTCAGTAACAGT     |

Fonte: autor

**Tabela 2:** Função dos genes utilizados nos ensaios de PCR em tempo real.

| GENE         | FUNÇÃO                                                                                                                                                                                                         |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ARG-1        | A enzima ARG-1 compete com a enzima iNOS por arginina e, dessa forma, evita que ocorra produção de NO, uma função dos macrófagos M1 (Hey et al., 1997).                                                        |
| iNOS         | O fenótipo M1 é caracterizado pela alta produção de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio (SICA; MANTOVANI, 2012).                                                                                  |
| CD-86        | Uma vez ativados, os macrófagos M1 caracterizam-se pela secreção de citocinas pró-inflamatórias e fenotipicamente, expressam níveis elevados de moléculas coestimuladoras CD86 (ARAS; ZAIDI, 2017)             |
| TGF- $\beta$ | O TGF- $\beta$ é um fator imunossupressor bem conhecido que está envolvido na inibição de respostas inflamatórias excessivas, TGF- $\beta$ induz a polarização do macrófago M2 (Kelly et al., 2017)            |
| CD-206       | Normalmente expresso no subtipo M2, mas não no M1 e, portanto, serve como marcador útil para identificar o fenótipo M2 (Xu et al., 2019)                                                                       |
| IL-1 $\beta$ | Citocina pró-inflamatória fundamental para respostas de defesa do hospedeiro à infecção e lesão (Dinarello, 1996)                                                                                              |
| IL-6         | Macrófagos classicamente ativados ou M1, que são pró-inflamatórios e polarizados por lipopolissacarídeos (LPS), produzem citocinas pró-inflamatórias, como interleucina IL-6 (Shapouri-Moghaddam et al., 2018) |

Fonte: autor

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

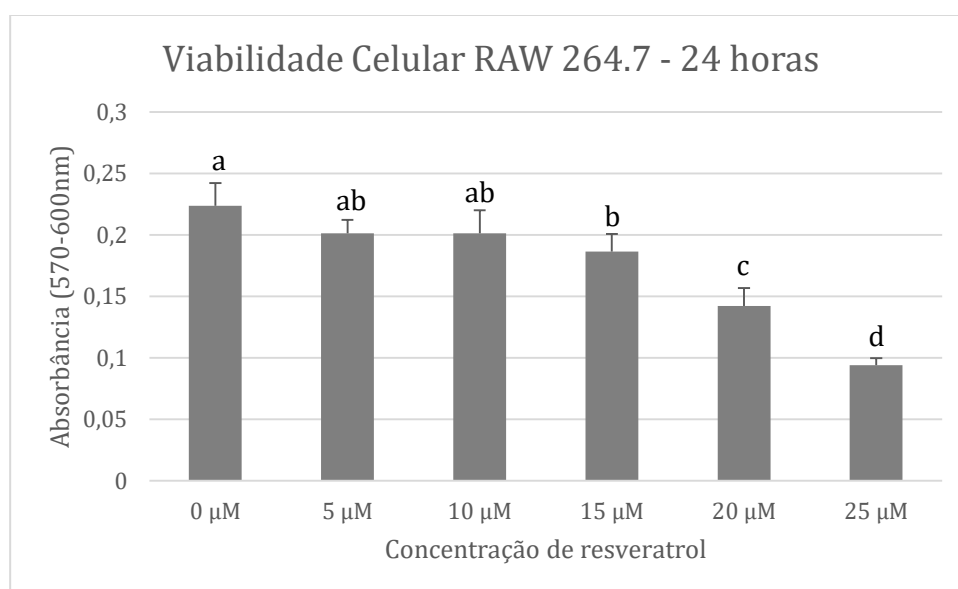
Os dados quantitativos foram avaliados quanto a sua normalidade e homoscedasticidade para a determinação do teste estatístico mais adequado ( $\alpha = 5$ ). Constatada a não-normalidade dos dados amostrais, foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls quando apropriado. Todas as análises foram feitas com o software SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) e o nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES

Os resultados mostraram que a viabilidade celular variou em função da concentração de resveratrol. As concentrações mais baixas (5 e 10  $\mu\text{M}$ ) não promoveram efeitos significantes da viabilidade celular comparado ao controle. Em contraste, as concentrações de 15 e 20  $\mu\text{M}$  reduziram a viabilidade celular, enquanto a concentração de 25  $\mu\text{M}$  levou a uma redução mais pronunciada.

**Figura 4.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da viabilidade celular de macrófagos cultivados por 24 horas com diferentes concentrações de resveratrol no meio de cultura. Valores expressos em absorbância (570-600nm). Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).

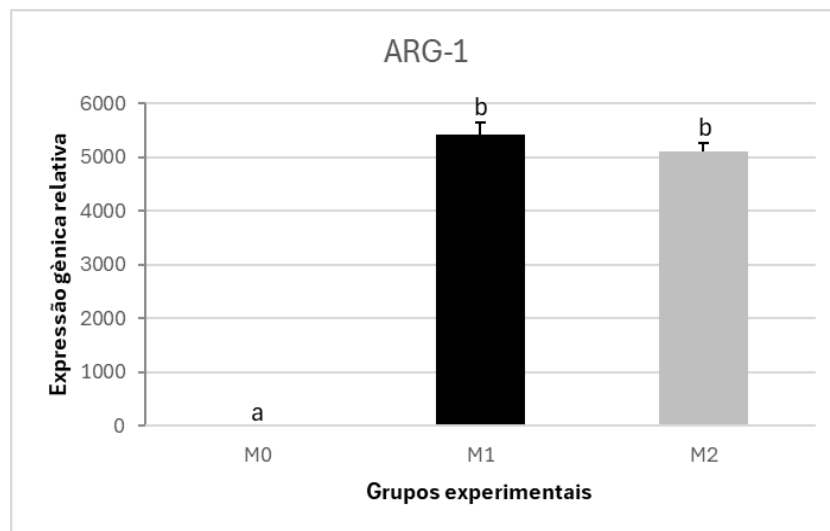


Fonte: autor

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS PREVIAMENTE AO PLAQUEAMENTO

Previamente ao plaqueamento, observou-se que as culturas M1 e M2 exibiram níveis de expressão de ARG-1 superiores aos observados para M0 (Kruskal-Wallis;  $p<0,05$ , Figura 5). Não foi observada diferença estatística entre os valores dos grupos M1 e M2 para este parâmetro ( $p>0,05$ ).

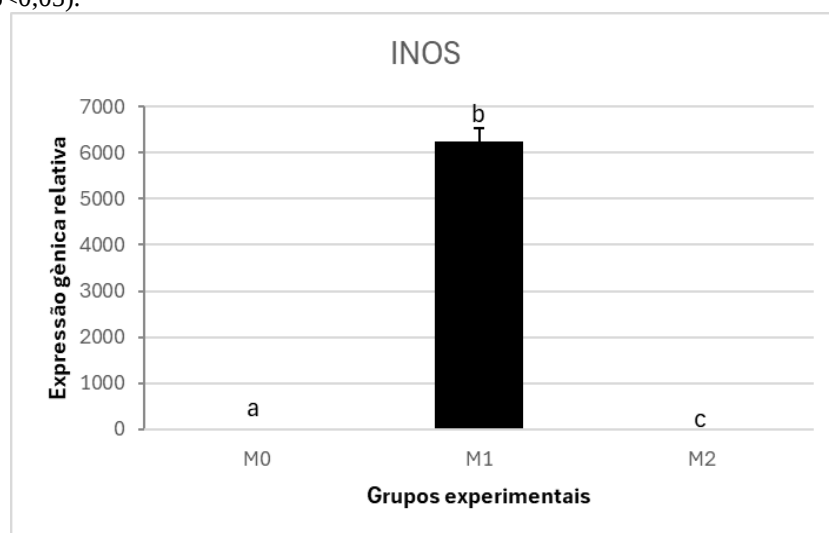
**Figura 5.** Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa de arginase (ARG-1) em macrófagos cultivados apenas ao meio de crescimento (M0), expostos adicionalmente ao LPS (M1) ou à interleucina – 4 (M2) por 48 horas. Valores calibrados pela expressão de M0 e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).



Fonte: autor

Culturas M1 exibiram os maiores níveis de expressão de iNOS superiores aos dos demais grupos, (Kruskal-Wallis,  $p<0,05$ ; Figura 6) seguido por M0 ( $p<0,05$ ). O grupo M2 exibiu os menores valores para este parâmetro ( $p<0,05$ ).

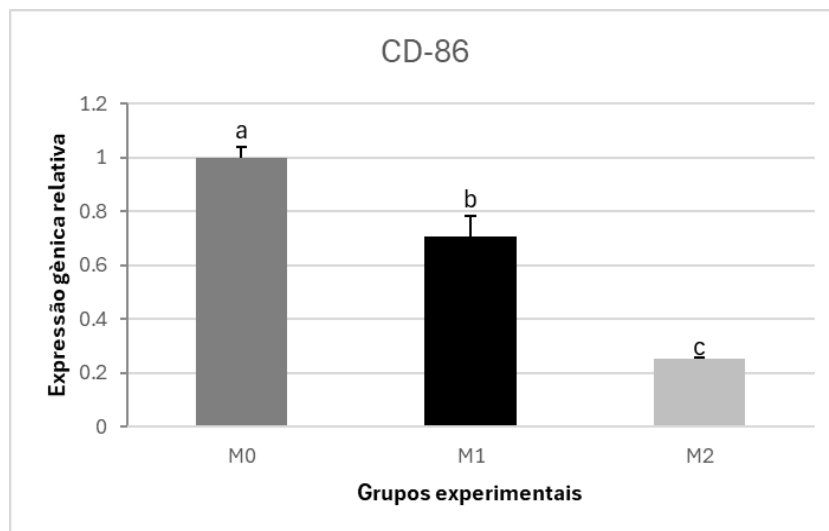
**Figura 6.** Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos cultivados apenas ao meio de crescimento (M0), expostos adicionalmente ao LPS (M1) ou à interleucina – 4 (M2) por 48 horas. Valores calibrados pela expressão de M0 e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).



Fonte: autor

A expressão de CD-86 foi maior em culturas M0 (Kruskal-Wallis,  $p<0,05$ ; Figura 7), seguido por M1 ( $p<0,05$ ) e por M2, com os menores níveis de expressão ( $p<0,05$ ).

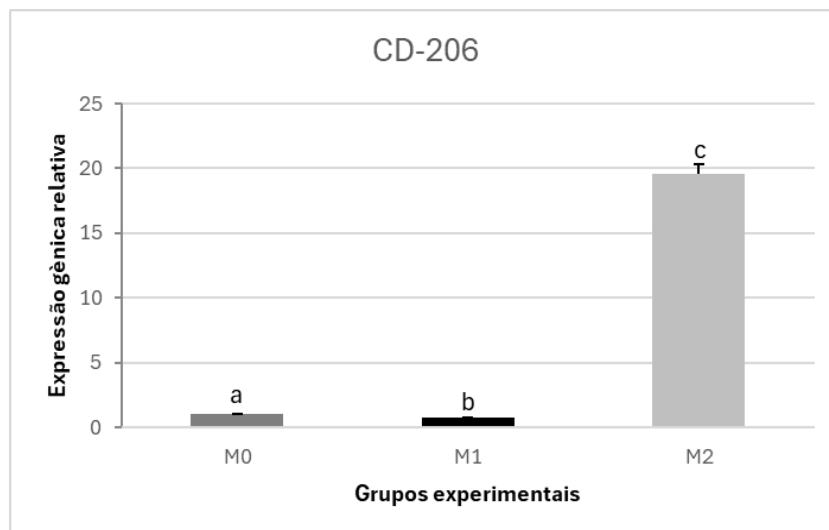
**Figura 7.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-86 em macrófagos cultivados apenas ao meio de crescimento (M0), expostos adicionalmente ao LPS (M1) ou à interleucina – 4 (M2) por 48 horas. Valores calibrados pela expressão de M0 e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).



Fonte: autor

O marcador CD-206 foi mais expresso em culturas M2 (Kruskal-Wallis,  $p<0,05$ ; Figura 8) em relação aos demais grupos, seguido por M0 ( $p<0,05$ ) e por M1, com os menores níveis de expressão ( $p<0,05$ ).

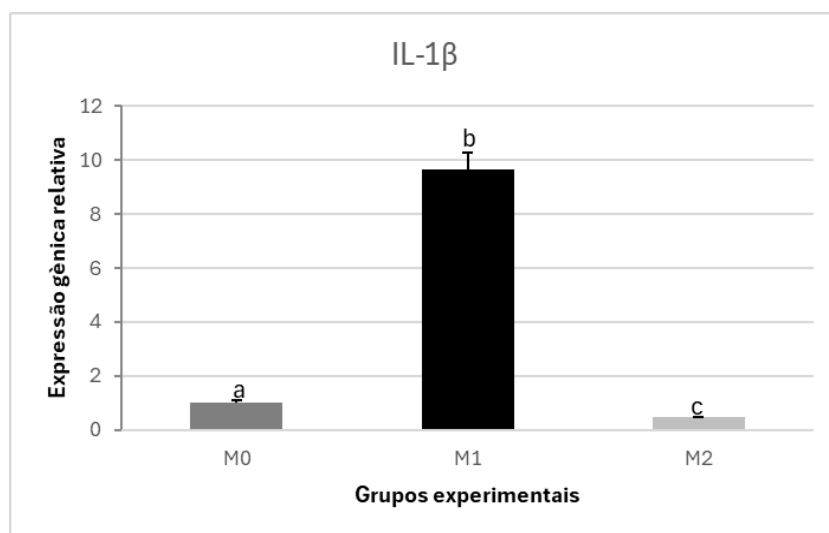
**Figura 8.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-206 em macrófagos cultivados apenas ao meio de crescimento (M0), expostos adicionalmente ao LPS (M1) ou à interleucina – 4 (M2) por 48 horas. Valores calibrados pela expressão de M0 e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).



Fonte: autor

A expressão de IL-1 $\beta$  foi mais alta em culturas M1 em relação aos demais grupos (Kruskal-Wallis,  $P < 0,05$ ; Figura 9), seguida por M0 ( $p < 0,05$ ) e por M2, com os menores níveis ( $p < 0,05$ ).

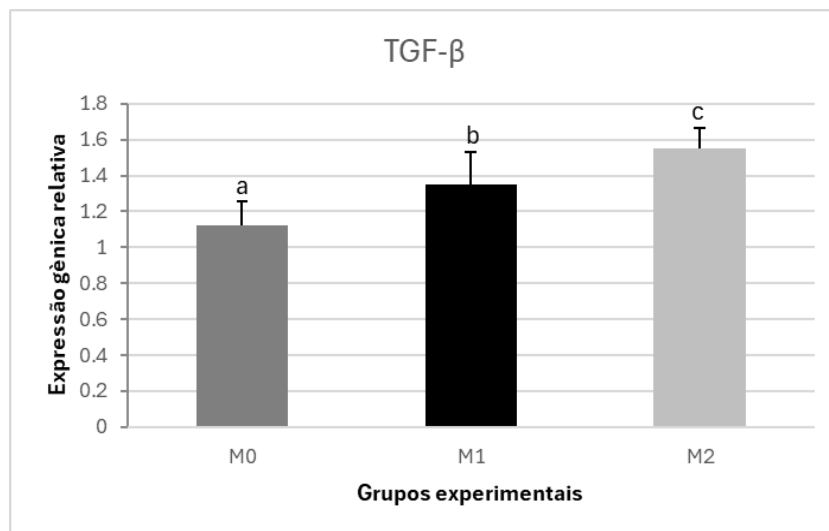
**Figura 9.** Valores médios  $\pm$  desvios padrões da expressão gênica relativa da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) em macrófagos cultivados apenas ao meio de crescimento (M0), expostos adicionalmente ao LPS (M1) ou à interleucina – 4 (M2) por 48 horas. Valores calibrados pela expressão de M0 e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significante ( $p < 0,05$ ).



Fonte: autor

Culturas M2 exibiram os maiores níveis de TGF- $\beta$  (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 10), seguido por M1 ( $p < 0,05$ ) e por M0, com os menores valores ( $p < 0,05$ ).

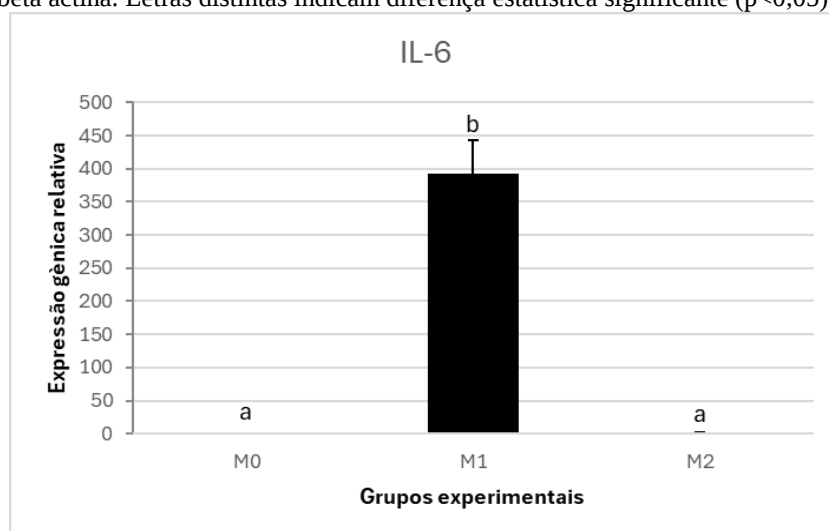
**Figura 10.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) em macrófagos cultivados apenas ao meio de crescimento (M0), expostos adicionalmente ao LPS (M1) ou à interleucina – 4 (M2) por 48 horas. Valores calibrados pela expressão de M0 e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).



Fonte: autor

A IL-6 foi mais expressa em culturas M1 em relação aos demais grupos (Kruskal-Wallis,  $p<0,05$ ; Figura 11), seguido por M0 e M2, com valores semelhantes entre si ( $p>0,05$ ).

**Figura 11.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa da interleucina 6 (IL-6) em macrófagos cultivados apenas ao meio de crescimento (M0), expostos adicionalmente ao LPS (M1) ou à interleucina – 4 (M2) por 48 horas. Valores calibrados pela expressão de M0 e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).



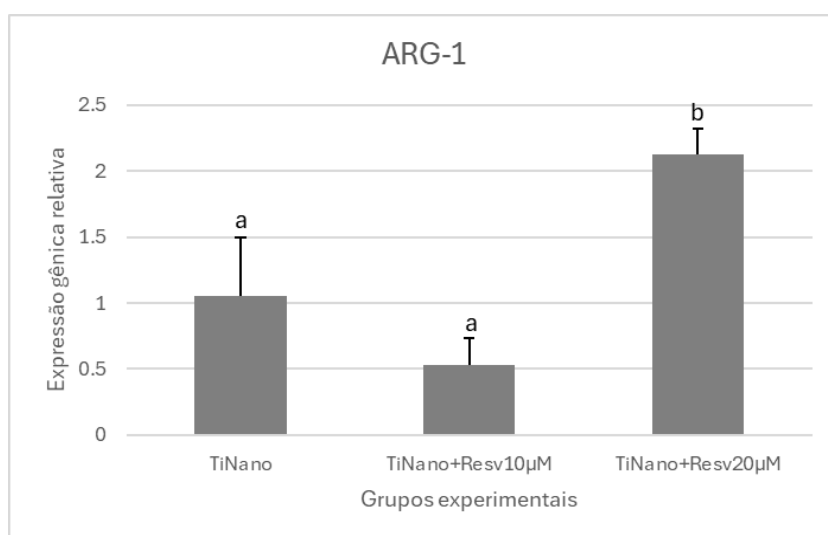
Fonte: autor

### 4.3 EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES NANOESTRUTURADAS DE TITÂNIO COM RESVERATROL SOBRE A POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS

#### 4.3.1 MACRÓFAGOS NÃO POLARIZADOS (M0)

Após 48 horas de cultivo sobre as diferentes superfícies de titânio com nanotopografia, foi observado que macrófagos M0 cultivados sobre TiNano+REV20 $\mu$ M exibiram maiores níveis de expressão de ARG-1 quando comparados aos dos demais grupos experimentais (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 12). Não foram observadas diferenças estatisticamente relevantes para os valores obtidos em TiNano e TiNano+Resv10  $\mu$ M ( $p > 0,05$ ).

**Figura 12.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa de arginase (ARG-1) em macrófagos não polarizados, cultivados apenas ao meio de crescimento (M0) por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

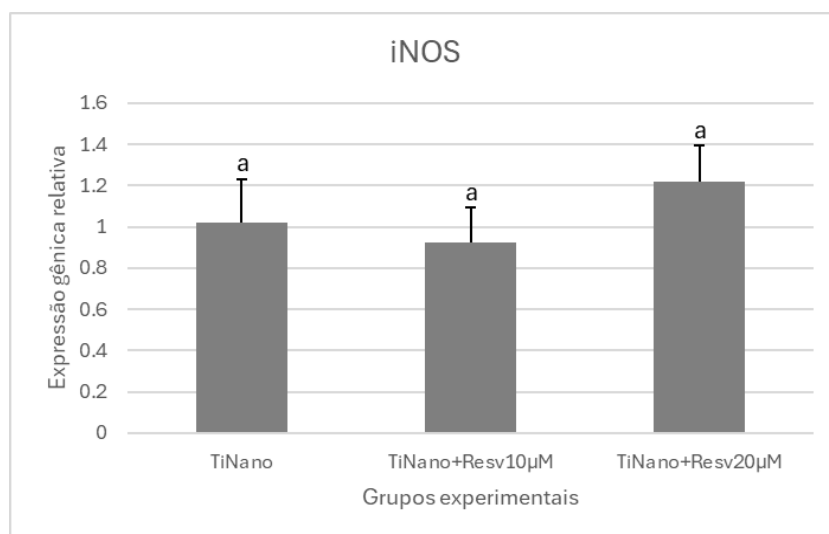


Fonte: autor

Não foram observadas diferenças relevantes entre os grupos experimentais para os níveis de expressão gênica de iNOS (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ; Figura 13).

**Figura 13.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos não polarizados, cultivados apenas ao meio de crescimento (M0) por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com

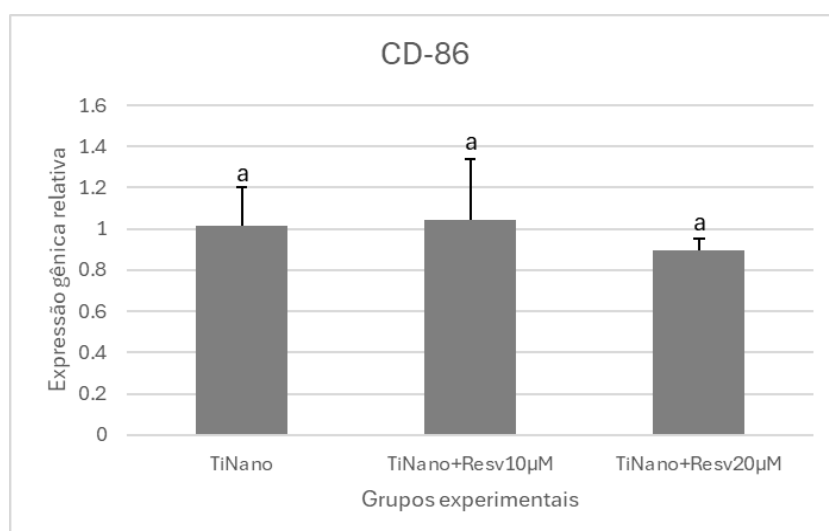
resveratrol nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  (TiNano+Resv10 $\mu\text{M}$ ) ou 20  $\mu\text{M}$  (TiNano+Resv20 $\mu\text{M}$ ). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).



Fonte: autor

Os níveis de expressão de CD-86 não variaram em função dos grupos avaliados (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ; Figura 14).

**Figura 14.** Valores médios  $\pm$  desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-86 em macrófagos não polarizados, cultivados apenas ao meio de crescimento (M0) por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  (TiNano+Resv10 $\mu\text{M}$ ) ou 20  $\mu\text{M}$  (TiNano+Resv20 $\mu\text{M}$ ). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

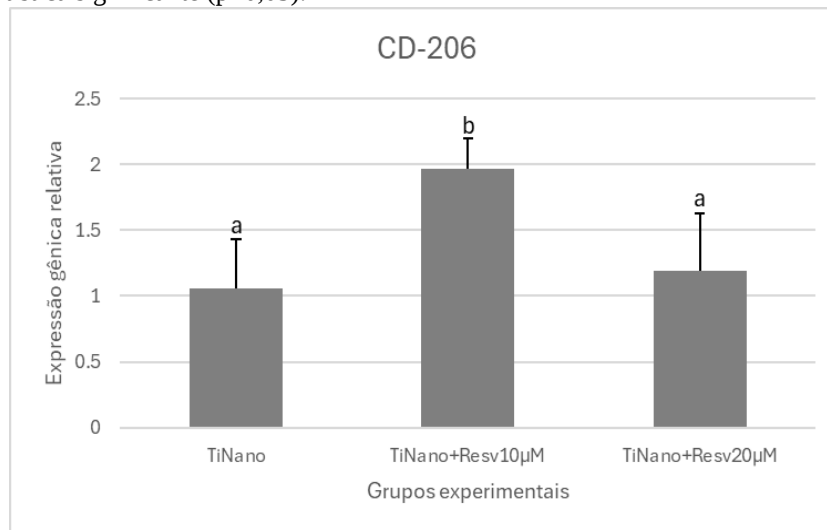


Fonte: autor

A expressão de CD-206 em células M0 cultivadas sobre TiNano+Resv10 $\mu\text{M}$  foi

superior em relação a dos demais grupos experimentais (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 15), não sendo observadas diferenças significantes nas demais comparações ( $p > 0,05$ ).

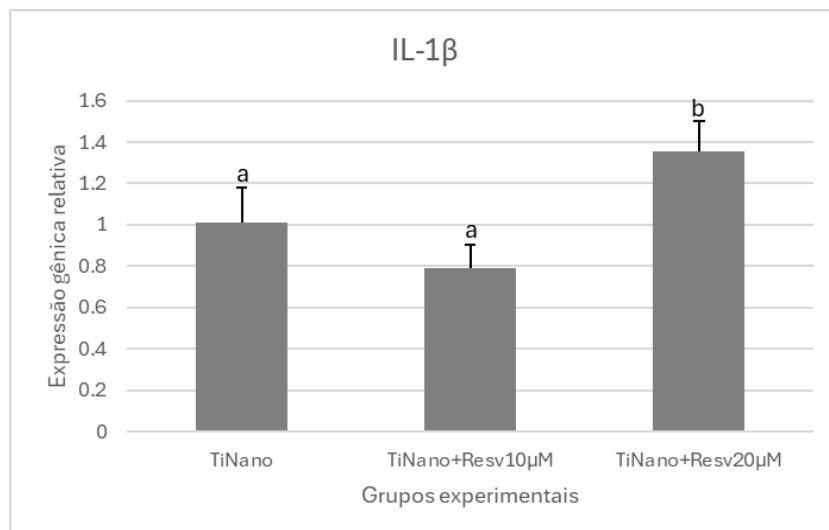
**Figura 15.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-206 em macrófagos não polarizados, cultivados apenas ao meio de crescimento (M0) por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).



Fonte: autor

A expressão de IL-1 $\beta$  foi superior em culturas M0 cultivadas sobre Ti-Nano20  $\mu$ M quando comparado a dos demais grupos experimentais (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 16). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores dos demais grupos ( $p > 0,05$ ).

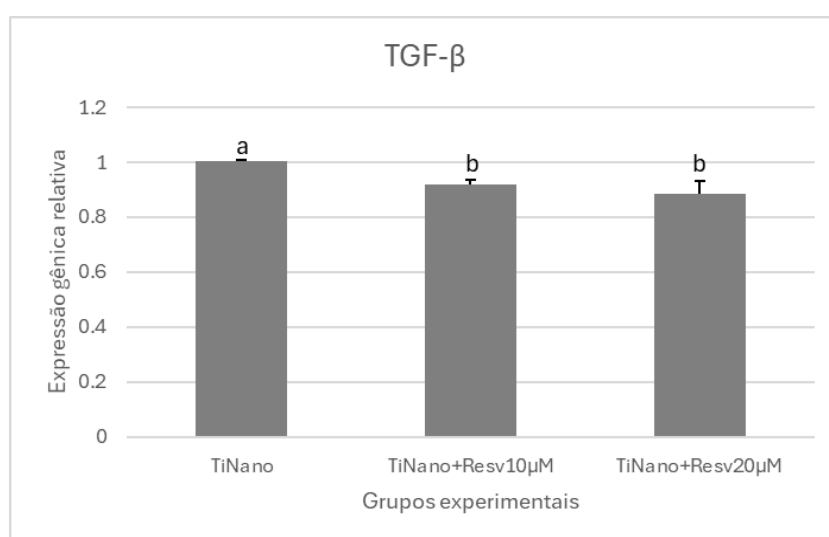
**Figura 16.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) em macrófagos não polarizados, cultivados apenas ao meio de crescimento (M0) por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).



Fonte: autor

Após 48h, observou-se redução da expressão do TGF-β nos grupos TiNano+10μM e TiNano+Resv20μM em relação ao controle, TiNano (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 17). Não foram observadas diferenças entre os valores de TiNano+Resv10 μM e TiNano+Resv20 μM ( $p > 0,05$ ).

**Figura 17.** Valores médios ± desvios padrões da expressão gênica relativa do fator de crescimento transformador beta (TGF-β) em macrófagos não polarizados, cultivados apenas ao meio de crescimento (M0) por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10 μM (TiNano+Resv10μM) ou 20 μM (TiNano+Resv20μM). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).



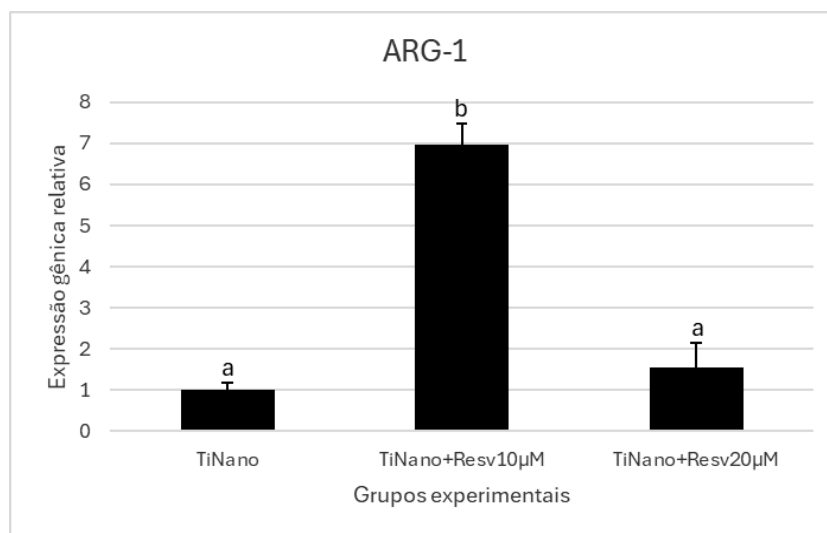
Fonte: autor

Em macrófagos M0, não foi detectada a expressão gênica de interleucina 6 em nenhum dos grupos avaliados.

#### 4.3.2 MACRÓFAGOS M1

Em macrófagos M1, foram observados maiores níveis de expressão de ARG-1 nos grupos TiNano+Resv10  $\mu$ M quando comparado aos demais grupos experimentais (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 18). Não houve diferença estatisticamente significativa para as demais comparações ( $p > 0,05$ ).

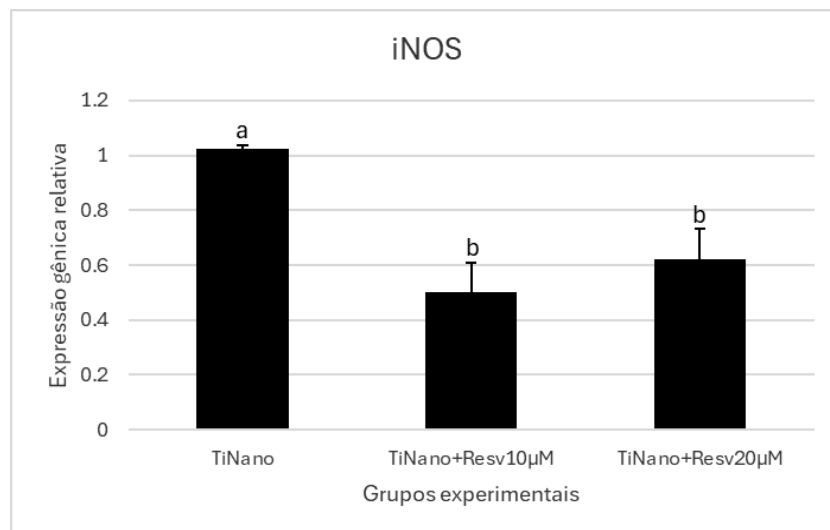
**Figura 18.** Valores médios  $\pm$  desvios padrões da expressão gênica relativa de arginase (ARG-1) em macrófagos previamente polarizados com LPS (M1) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).



Fonte: autor

A expressão de iNOS foi reduzida nos grupos TiNano+10 $\mu$ M e TiNano+Resv20 $\mu$ M em relação ao controle, TiNano (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 19). Não foram observadas diferenças estatisticamente relevantes para as demais comparações ( $p > 0,05$ ).

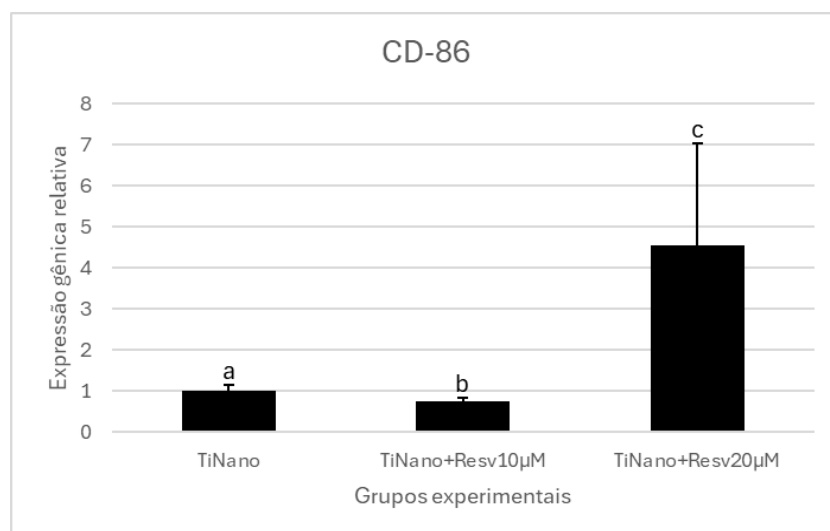
**Figura 19.** Valores médios  $\pm$  desvios padrões da expressão gênica relativa da enzima oxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos previamente polarizados com LPS (M1) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).



Fonte: autor

A expressão de CD-86 variou em macrófagos M1 cultivados nas diferentes superfícies, sendo superior para TiNano+Resv20uM (Kruskal-Wallis,  $p>0,05$ ; Figura 20), seguido por TiNano ( $p<0,05$ ) e por TiNano+Resv10uM, com os menores valores ( $p<0,05$ ).

**Figura 20.** Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-86 em macrófagos previamente polarizados com LPS (M1) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10 µM (TiNano+Resv10µM) ou 20 µM (TiNano+Resv20µM). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).

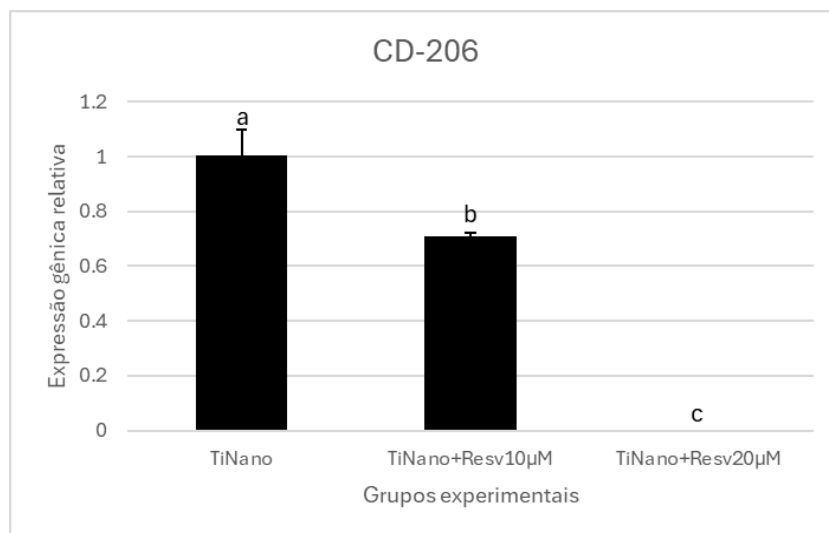


Fonte: autor

O grupo TiNano exibiu os maiores níveis de CD-206 (Kruskal-Wallis,  $p>0,05$ ;

Figura 21), seguido por TiNano+Resv10 $\mu$ M ( $p<0,05$ ) e TiNano+Resv20 $\mu$ M, com os menores valores ( $p<0,05$ ).

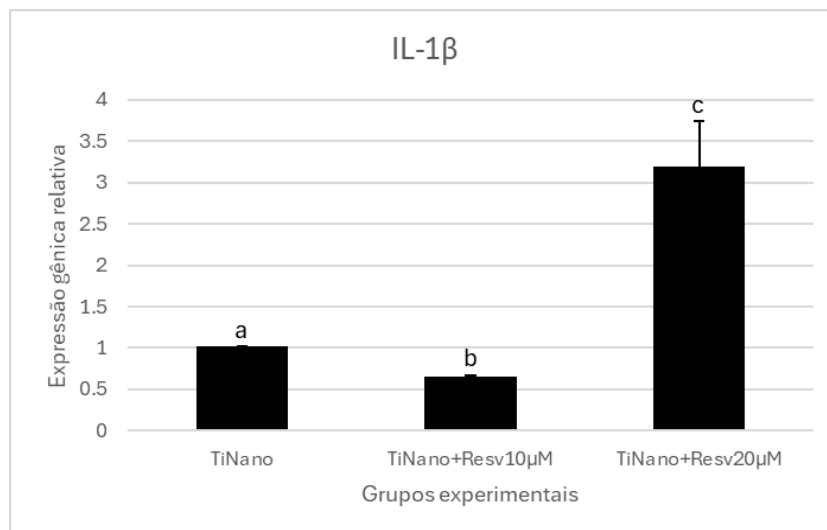
**Figura 21.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-206 em macrófagos previamente polarizados com LPS (M1) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).



Fonte: autor

O grupo TiNano+Resv20 $\mu$ M exibiu os maiores níveis de IL-1 $\beta$  em culturas de macrófagos M1 (Kruskal-Wallis,  $p<0,05$ ; Figura 22), seguido por TiNano ( $p<0,05$ ) e TiNano+Resv10 $\mu$ M, com os menores valores ( $p<0,05$ ).

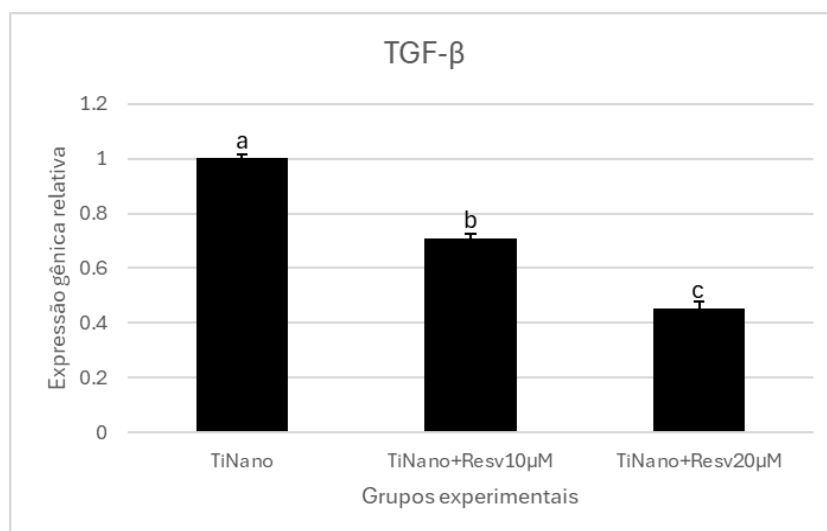
**Figura 22.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) em macrófagos previamente polarizados com LPS (M1) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).



Fonte: autor

A expressão de TGF- $\beta$  foi superior em TiNano em relação aos demais grupos (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 23), seguido por TiNano+Resv10 $\mu$ M ( $p < 0,05$ ) e por TiNano+Resv20 $\mu$ M, que exibiu os menores níveis desse gene ( $p < 0,05$ ).

**Figura 23.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) em macrófagos previamente polarizados com LPS (M1) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

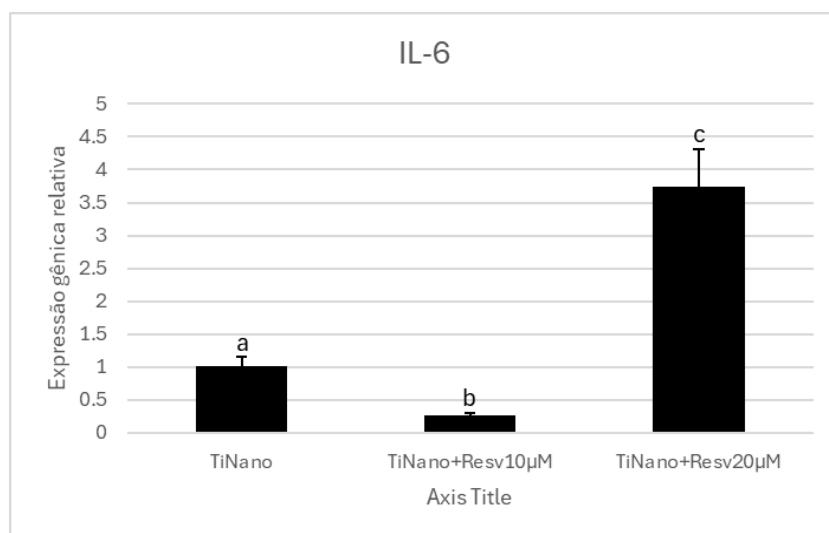


Fonte: autor

Em macrófagos M1, a expressão de IL-6 foi observada em todos os grupos experimentais, sendo superior em TiNano+Resv20 $\mu$ M (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 24), seguido por TiNano ( $p < 0,05$ ) e por TiNano+Resv10 $\mu$ M, com os menores valores

( $p < 0,05$ ).

**Figura 24.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa da interleucina 6 em macrófagos previamente polarizados com LPS (M1) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

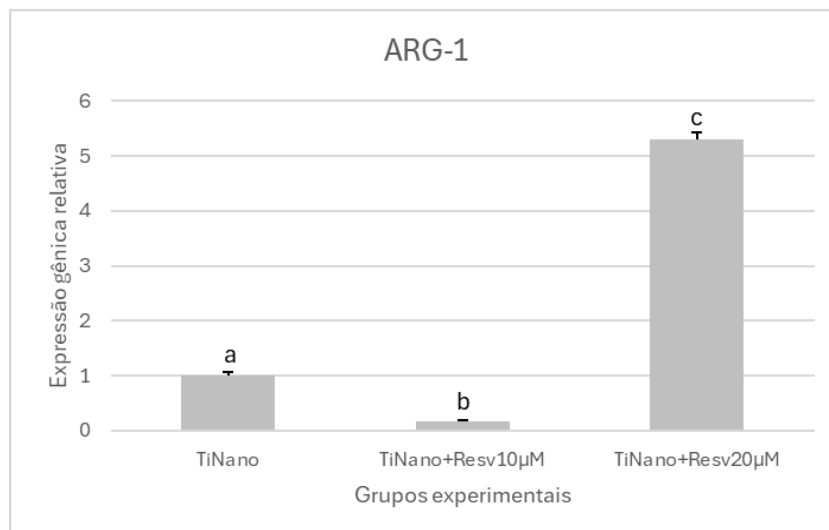


Fonte: autor

#### 4.3.3 MACRÓFAGOS M2

Em macrófagos M2, foram observados níveis superiores de ARG-1 para o grupo TiNano+Resv20 $\mu$ M (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 25), seguido por TiNano ( $p < 0,05$ ) e por TiNano+Resv10 $\mu$ M, com os menores valores ( $p < 0,05$ ).

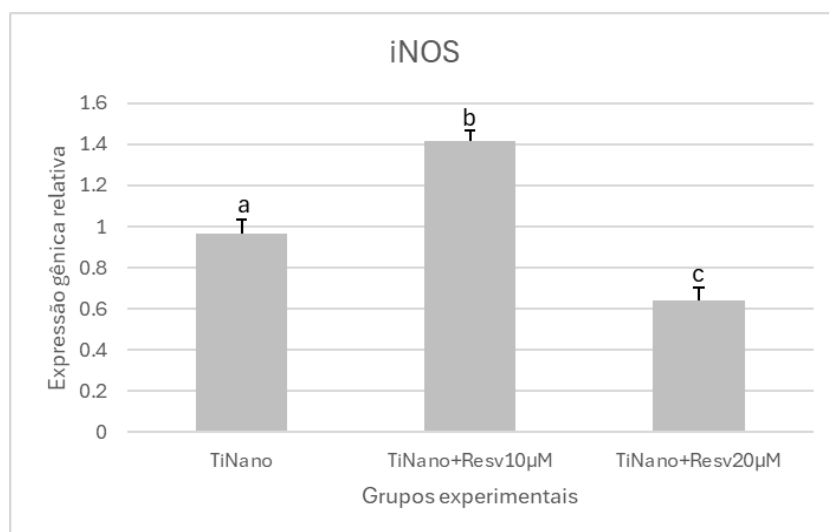
**Figura 25.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa de arginase (ARG-1) em macrófagos previamente polarizados com LPS (M1) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).



Fonte: autor

Houve maior expressão de iNOS após cultivo sobre superfícies TiNano+Resv10µM (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 26), seguido por TiNano ( $p < 0,05$ ) e por TiNano+Resv20µM, com os menores valores ( $p < 0,05$ ).

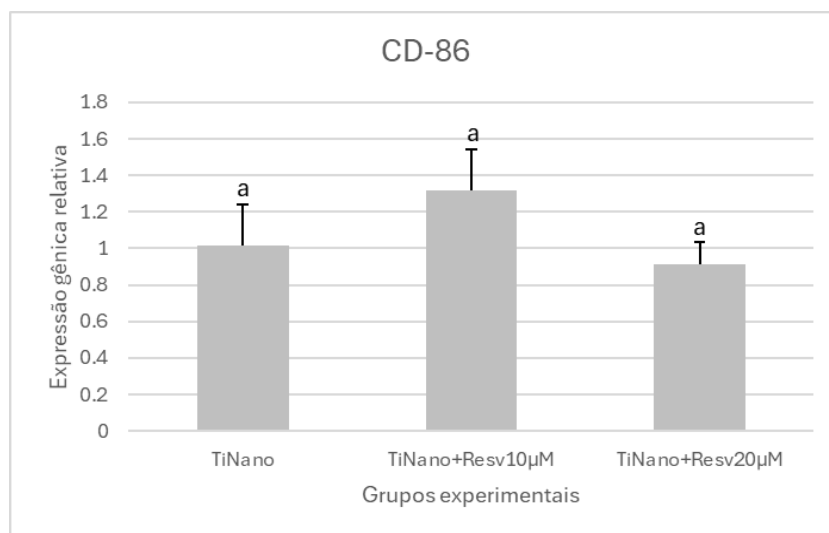
**Figura 26.** Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa da enzima oxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos previamente polarizados com IL-4 (M2) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10 µM (TiNano+Resv10µM) ou 20 µM (TiNano+Resv20µM). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).



Fonte: autor

Em macrófagos M2, os níveis de expressão de CD-86 não variaram em função dos grupos avaliados (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ; Figura 27).

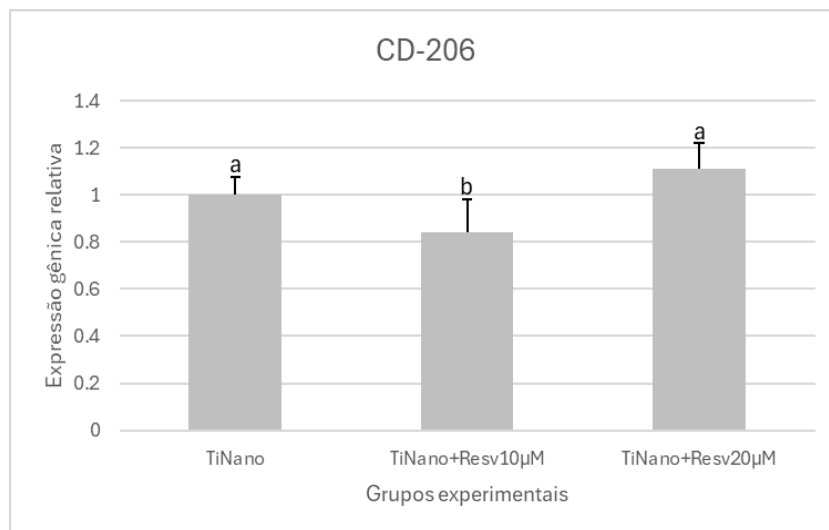
**Figura 27.** Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-86 em macrófagos previamente polarizados com IL-4 (M2) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).



Fonte: autor

A expressão de CD-206 foi inferior para TiNano+Resv10 $\mu$ M em relação aos demais grupos experimentais (Kruskal-Wallis,  $p>0,05$ ; Figura 28), não havendo diferenças significantes para as demais comparações ( $p>0,05$ ).

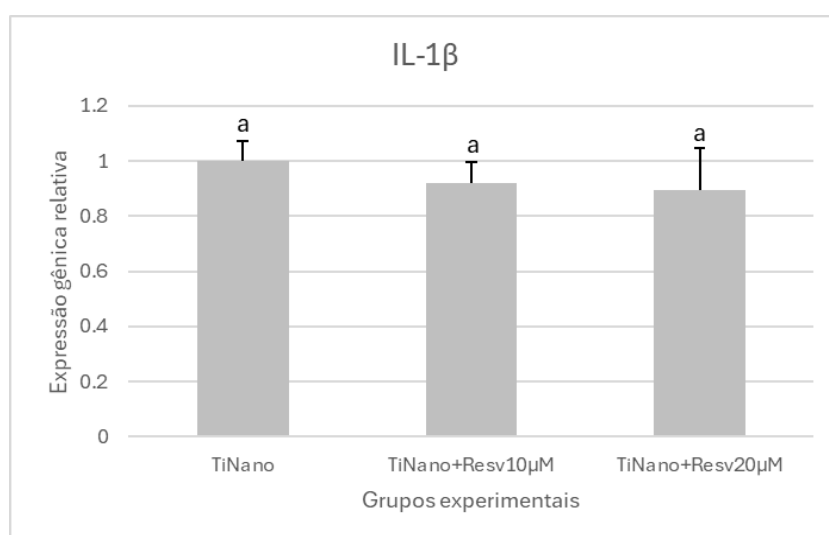
**Figura 28.** Valores médios±desvios padrões da expressão gênica relativa do marcador de superfície CD-206 em macrófagos previamente polarizados com IL-4 (M2) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).



Fonte: autor

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para os níveis de IL-1 $\beta$  obtidos nos diferentes grupos (Kruskal-Wallis,  $p>0,05$ ; Figura 29).

**Figura 29.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) em macrófagos previamente polarizados com IL-4 (M2) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).

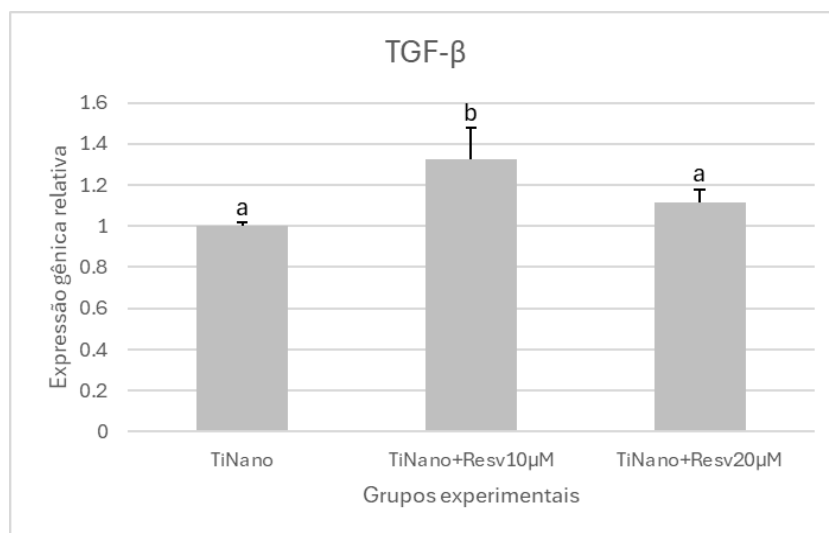


Fonte: autor

Em macrófagos M2, os níveis de TGF- $\beta$  foram superiores em iNano+Resv10 $\mu$ M

(Kruskal-Wallis,  $p>0,05$ ; Figura 30), seguido por TiNano e TiNano+Resv20 $\mu$ M, com os valores semelhantes entre si ( $p>0,05$ ).

**Figura 30.** Valores médios $\pm$ desvios padrões da expressão gênica relativa do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) em macrófagos previamente polarizados com IL-4 (M2) e cultivados por 48 horas sobre superfícies nanoestruturadas de titânio, funcionalizadas ou não (TiNano, controle) com resveratrol nas concentrações de 10  $\mu$ M (TiNano+Resv10 $\mu$ M) ou 20  $\mu$ M (TiNano+Resv20 $\mu$ M). Valores calibrados pela expressão de TiNano e normalizados pelo gene constitutivo, beta actina. Letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).



Fonte: autor

Em macrófagos M2, não foi detectada a expressão gênica de interleucina 6 em nenhum dos grupos avaliados.

## 5 DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, a hipótese nula ( $H_0$ ) deste trabalho foi rejeitada. A funcionalização com resveratrol modificou a resposta das diferentes populações de macrófagos à superfície de titânio com nanotopografia. Observamos que a resposta macrofágica à funcionalização variou conforme a concentração de resveratrol utilizada. Em culturas M0 e M1, a funcionalização com resveratrol a 10 $\mu$ M promoveu o aumento de ARG-1 e reduziu a expressão de CD-86 e de interleucinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, a concentração de 20 $\mu$ M resultou em aumento de CD-86, IL-1 $\beta$ , IL-6 e diminuição de CD-206 e TGF- $\beta$ , indicando uma tendência pró-inflamatória.

A utilização de polifenóis naturais para a funcionalização ou revestimento de superfícies bioativas já foi investigada por outros grupos de pesquisa em titânio tratado quimicamente, vidros bioativos e hidroxiapatita (REGGIO et al., 2023). A modulação da resposta inflamatória mediada por biomateriais é uma estratégia para melhorar a regeneração dos tecidos, destacando a interação entre biomateriais e células imunitárias (PITCHAI et al., 2023). Neste estudo, analisamos o perfil de polarização de macrófagos comparando substratos de titânio com nanotopografia funcionalizado com diferentes concentrações de resveratrol pela expressão de marcadores inflamatórios, suas funções estão descritas na tabela 2. A classificação M1/M2 é uma simplificação, os macrófagos podem exibir fenótipos sobrepostos dependendo da localização do tecido e do tipo de sinalização (Strizova et al., 2023).

Neste estudo, a nanotopografia de titânio foi obtida através de um tratamento de desoxidação e reoxidação controladas com solução de  $H_2O_2/H_2SO_4$ . Este procedimento simples gera uma superfície com rugosidade três vezes maior em comparação com a superfície não tratada (VARIOLA et al., 2008; BIGHETTI-TREVISAN et al., 2023). A topografia da superfície do implante influencia o fenótipo dos macrófagos, afetando suas funções pró-inflamatórias (semelhantes a M1) ou regenerativas (semelhantes a M2) (SHIRAZI et al., 2024). Estudos anteriores identificaram a nanotopografia como regulador importante de processos celulares e fisiológicos (CHRISTO et al., 2016). Pitchai et al. (2022), em revisão sistemática, apoiam a hipótese de que modificações topográficas e físico-químicas específicas da superfície do titânio podem modular a resposta fenotípica de macrófagos aderentes. Além disso, foi demonstrado que a

nanotopografia das superfícies de titânio pode estimular os mastócitos *in vitro*, sugerindo que esse tipo de superfície pode modular a resposta imune-inflamatória na interface tecido-implante (MARCATTI et al., 2017).

Considerando que os fenótipos dos macrófagos mudam com o ambiente circundante (YANG et al., 2021; XU et al., 2019), é de grande relevância modificar as superfícies dos implantes para aprimorar as interações iniciais célula-substrato. Assim, para o presente estudo, foi selecionado um modelo *in vitro* que mimetiza o contato direto do implante com macrófagos, utilizando uma superfície de titânio com nanotopografia funcionalizada capaz de modular a polarização macrofágica. Isso visa um melhor aproveitamento do processo de funcionalização e maior disponibilização da molécula selecionada.

Os macrófagos são as primeiras células a interagir com agentes patogênicos e dispositivos implantados. Estudos clássicos demonstraram que os macrófagos são rapidamente recrutados para locais infecciosos e de lesão, desempenhando papéis críticos na imunidade inata (MIRON et al., 2016). Neste estudo, utilizamos macrófagos da linhagem RAW 264.7, um bom modelo para avaliar o efeito de moléculas antioxidantes como o resveratrol (YANG et al., 2014).

Macrófagos polarizados diferem em expressão de receptores, produção de citocinas, função efetora e repertórios de quimiocinas (MANTOVANI et al., 2004). O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), presente na membrana externa das bactérias, ativa macrófagos para um fenótipo pró-inflamatório, desencadeando vias de sinalização que controlam a produção de citocinas, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6 (CAPIRALLA et al., 2012). Já a interleucina 4 é utilizada para polarizar macrófagos em um estado anti-inflamatório M2 (GADANI et al., 2012; HU et al., 2015)

A polarização dos macrófagos altera a expressão de marcadores de superfície celular. Macrófagos M1 superexpressam CD80, CD86 e CD16/32, segregando citocinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, macrófagos M2 apresentam maior expressão de ARG-1, CD206, IL-10 e quimiocinas CCL17 e CCL22, desempenhando papéis importantes na reparação de tecidos, angiogênese e metabolismo (Van Dyken e Locksley, 2013; YUNNA et al., 2020). No presente estudo, o LPS e a IL-4 foram utilizados para promover a polarização dos macrófagos nos fenótipos M1 e M2, respectivamente. A partir dos dados de expressão gênica, verificamos que a estratégia foi eficaz, tendo em vista que houve maior expressão dos marcadores pró-inflamatórios iNOS, IL-1 $\beta$  e IL-6 em populações de macrófagos M1, enquanto macrófagos M2

exibiram maiores níveis de CD-206 e TGF- $\beta$ , marcadores do fenótipo anti-inflamatório.

O resveratrol é anti-inflamatório e anti-envelhecimento, amplamente investigado para a regulação do gasto energético e no tratamento de doenças endócrinas (BAUR et al., 2006; CHEN et al., 2021). Estudos *in vitro* e *in vivo* relatam sua atividade anticancerígena, inibição da agregação plaquetária, ação antioxidante e anti-inflamatória (PACE-ASCIAC et al., 1995; JANG et al., 1997; BAVARESCO et al., 2012). Para definir a concentração de resveratrol para o procedimento de funcionalização, foi realizado um ensaio de citotoxicidade. O protocolo de resazurina se mostrou eficaz na determinação da viabilidade celular e na identificação da concentração potencialmente citotóxica de resveratrol. Estes resultados indicam que concentrações de até 10  $\mu$ M pode ser considerada para estudos futuros, balanceando a eficácia do resveratrol com a minimização da toxicidade celular. Nesta investigação, além da concentração de 10  $\mu$ M, usamos 20  $\mu$ M e adicionamos o tratamento de superfície com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, simulando uma condição *in vitro* de interação com a superfície do titânio frente à polarização em diferentes subpopulações de macrófagos.

Neste estudo, a ação do resveratrol variou nas diferentes populações de macrófagos e em função da concentração utilizada para a funcionalização das superfícies de titânio nanoestruturadas. Em macrófagos M0, a funcionalização de Ti-Nano com resveratrol modulou positivamente a expressão de CD-206 quando usado a 10  $\mu$ M, enquanto na concentração de 20  $\mu$ M houve aumento da expressão de ARG-1 e IL-1 $\beta$ . Em macrófagos M1, o resveratrol a 10  $\mu$ M reduziu significativamente a expressão de iNOS, CD-86, IL-1 $\beta$  e IL-6, enquanto que a concentração de 20  $\mu$ M promoveu maiores níveis de CD-86, IL-1 $\beta$  e IL-6. Assim, no presente estudo, o efeito anti-inflamatório do resveratrol em culturas M0 e M1 foi observado na concentração de 10  $\mu$ M.

Os resultados deste trabalho endossam os achados anti-inflamatórios dos demais pesquisadores, visto que o resveratrol usado na concentração de 10  $\mu$ M reduziu a expressão de interleucinas pró-inflamatórias, corroborando com os achados de Yang et al. (2014) em que o resveratrol inibiu a liberação de IL-6, TNF- $\alpha$  e NO induzida por LPS, antagonizando os efeitos inflamatórios. Outros estudos mostraram que a ação anti-inflamatória do resveratrol previniu a ativação induzida por LPS de macrófagos RAW 264.7 murinos e células BV-2 microgliais, além de prevenir o efeito pró-inflamatório em macrófagos, inibindo a ativação de STAT 1 e STAT3 e NF $\kappa$ B (REGE et al., 2014; CAPIRALLA et al., 2012).

No estudo de YI et al. (2011), macrófagos RAW 264.7 foram tratados com LPS e estimulados com resveratrol na concentração 10  $\mu$ M, foi observado a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e inibição do fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  nas células tratadas com LPS. LI et al. (2020) investigou o efeito do resveratrol na polarização em células RAW 264.7, constatou que o pré-tratamento na concentração de 10  $\mu$ M diminuiu os níveis do marcador M1 ou citocinas pró-inflamatórias. O estudo de GUO et al. (2023) induziu a polarização de macrófagos RAW264.7 para o tipo M1 para gerar resposta inflamatória pela combinação de lipopolissacarídeo (LPS) (200 ng/mL) + interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (2,5 ng/mL). LPS e IFN- $\gamma$  aumentaram os níveis de fatores inflamatórios de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 em RAW 264.7, e a proporção de macrófagos do tipo M1 também foi aumentada, mas a expressão de fatores inflamatórios diminuiu após a administração de resveratrol, o que confirmou o efeito anti-inflamatório do polifenol. O melhor efeito foi visto no grupo de alta dose (10  $\mu$ mol /L). Contudo, no presente estudo, verificou-se efeito pró-inflamatório do resveratrol quando utilizado em alta concentração (20  $\mu$ M), sugerindo um limiar de segurança quanto à exposição ao polifenol.

Em macrófagos M2, a expressão dos marcadores variou em função das concentrações de resveratrol utilizadas para a funcionalização das superfícies de Ti-Nano, sendo que a 10  $\mu$ M promoveu maiores níveis de iNOS e TGF- $\beta$ , e reduziu níveis de ARG-1 e CD-206. Quando utilizado a 20  $\mu$ M, houve redução de iNOS e aumento de ARG-1. Esses resultados sugerem que, para essa população celular, maiores concentrações podem ser necessárias para a modulação de genes anti-inflamatórios.

Os macrófagos podem ser ativados para induzir IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , proteínas do complemento e prostaglandinas no sistema imunitário. As citocinas expressas por macrófagos estão associadas à estimulação ou inibição da osteoclastogênese (SRIVASTAVA et al., 2018). Neste sentido, a manutenção de um ambiente favorável ao reparo tecidual pode ser interessante para as interações entre implante e tecidos, particularmente em pacientes que exibam comorbidades inflamatórias locais ou sistêmicas.

De modo geral, os tratamentos de superfície aqui propostos podem influenciar na polarização de macrófagos. Essa estratégia visa acelerar o reparo peri-implantar, o que poderia beneficiar pacientes em condições de desafio clínico: osteoporose; pacientes sistemicamente comprometidos; portadores de doenças autoimunes. Além disso, pode acelerar o processo regenerativo na osseointegração dos implantes de

titânio. Uma vez que macrófagos podem ser modulados para fenótipos reguladores e anti-inflamatórios, o controle do equilíbrio M1/M2 tem potencial terapêutico em muitas doenças (NAHRENDORF et al., 2007). Testes *in vivo* são de suma importância para uma maior compreensão dos efeitos do resveratrol e de sua interação com a complexidade desse microambiente, em que fatores inerentes aos animais como idade, peso corpóreo, temperatura, fatores genéticos, estados nutricionais e patológicos, e outros como: concentração da molécula testada e solubilidade nos fluídos orgânicos podem atuar (BEDNARCZUK et al., 2010).

Os resultados deste estudo contribuem para a compreensão dos efeitos de substâncias antioxidantes nos eventos iniciais da interação célula-substrato em implantes de titânio tanto em condição fisiológica quanto patológica, evidenciando a efetividade das modificações propostas na polarização de macrófagos e suas consequências no processo de imunomodulação. Estudos posteriores são necessários, especialmente em modelos *in vivo*, para determinar condições clinicamente viáveis dessas estratégias.

## 6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados do presente estudo, concluiu-se que:

- O uso do protocolo de resazurina para avaliar a viabilidade celular mostrou-se uma abordagem confiável para determinar a concentração apropriada de resveratrol em culturas celulares. A concentração de até 10  $\mu$ M sendo recomendada para equilibrar eficácia e segurança em estudos com células RAW 264.7.

- De modo geral, macrófagos M1 exibiram maior expressão de marcadores pró-inflamatórios (IL-1  $\beta$ , IL-6, iNOS), enquanto que macrófagos M2 exibiram maior expressão de marcadores anti-inflamatórios (CD-206 e TGF- $\beta$ ).

- O efeito da funcionalização de Ti-Nano com resveratrol variou em função das diferentes subpopulações de macrófagos estudadas. A concentração de 10  $\mu$ M se mostrou mais vantajosa por reduzir a expressão de interleucinas pró-inflamatórias e favorecer a expressão de marcadores do fenótipo anti-inflamatório em macrófagos M0 e M1, enquanto que, para macrófagos M2 a concentração de 20  $\mu$ M aumentou a expressão de marcadores anti-inflamatórios.

## REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T.; BRÅNEMARK, P.-I.; HANSSON, H.-A.; LINDSTRÖM, J.. Osseointegrated Titanium Implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 155-170, jan. 1981. MJS Publishing, Medical Journals Sweden AB. <http://dx.doi.org/10.3109/17453678108991776>.
- ALBREKTSSON, T. On long-term maintenance of the osseointegrated response. **Australian Prosthodontic Journal**, v. 7, p. 15-24, 1993.
- ALLOISIO, G.; CIACCIO, C.; FASCIGLIONE, G.F.; TARANTINO, U.; MARINI, S.; COLETTA, M.; GIOIA, M. Effects of Extracellular Osteoanabolic Agents on the Endogenous Response of Osteoblastic Cells. **Cells**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 2383, 10 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells10092383>.
- ANDERSON, James M.. Future challenges in their vitroandin vivoevaluation of biomaterial biocompatibility. **Regenerative Biomaterials**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 73-77, 10 mar. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/rb/rbw001>.
- ARAS, S.; ZAIDI, M. R.; TAMELEES traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 117, n. 11, p. 1583-1591, 24 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.356>.
- BAUR, Joseph A.; SINCLAIR, David A.. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 5, n. 6, p. 493-506, 26 maio 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2060>.
- BAVARESCO, L.; MATTIVI, F.; ROSSO, M.; FLAMINI, R. Effects of Elicitors, Viticultural Factors, and Enological Practices on Resveratrol and Stilbenes in Grapevine and Wine. **Mini-Reviews In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 12, n. 13, p. 1366-1381, 1 out. 2012. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/13895575112091366>.
- BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 123-134, 2010.
- BIGAGLI, E.; CINCI, L.; PACCOSI, S.; PARENTI, A.; D'AMBROSIO, M.; LUCERI, C. Nutritionally relevant concentrations of resveratrol and hydroxytyrosol mitigate oxidative burst of human granulocytes and monocytes and the production of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 43, p. 147-155, fev. 2017. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.12.012>.

BIGHETTI-TREVISAN, R. L.; FERRAZ, E. P.; SILVA, M. B. F.; ZATTA, G. C.; A., M. B. de; ROSA, A. L.; BELOTI, M. M.. Effect of osteoblasts on osteoclast differentiation and activity induced by titanium with nanotopography. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 229, p. 113448, set. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113448>.

BRANEMARK, P. Osseointegration and its experimental background. **The Journal Of Prosthetic Dentistry**, [S.L.], v. 50, n. 3, p. 399-410, set. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3913\(83\)80101-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3913(83)80101-2).

CAPIRALLA, Hemachander; VINGTDEUX, Valérie; ZHAO, Haitian; SANKOWSKI, Roman; AL-ABED, Yousef; DAVIES, Peter; MARAMBAUD, Philippe. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A $\beta$ -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B/STAT signaling cascade. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 120, n. 3, p. 461-472, 16 dez. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07594.x>.

CHEN X., SUN S., GENG T., Fan X, ZHAN G. S, ZHAO S., GENG. Y, JIN Q. Resveratrol reduces the progression of titanium particle-induced osteolysis via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. *Exp Ther Med*. 2021 Oct;22(4):1119. doi: 10.3892/etm.2021.10553. Epub 2021 Aug 4. PMID: 34504573; PMCID: PMC8383761.

CHIANG, S.; PAN, T.-M.. Beneficial effects of phytoestrogens and their metabolites produced by intestinal microflora on bone health. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 97, n. 4, p. 1489-1500, 15 jan. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4675-y>.

CHRISTO, S. N.; BACHHUKA, A.; DIENER, K. R.; MIERCZYNSKA, A.; HAYBALL, J. D.; VASILEV, K. The Role of Surface Nanotopography and Chemistry on Primary Neutrophil and Macrophage Cellular Responses. **Advanced Healthcare Materials**, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 956-965, 4 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/adhm.201500845>.

CORRÊA, M. G.; RIBEIRO, F. V.; PIMENTEL, S. P.; BENATTI, B. B.; SILVA, P. H. F.; CASATI, M. Z.; CIRANO, F. R. Impact of resveratrol in the reduction of the harmful effect of diabetes on peri-implant bone repair: bone-related gene expression, counter-torque and micro-ct analysis in rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, [S.L.], v. 79, n. 3, p. 174-181, 22 jul. 2020. MJS Publishing, Medical Journals Sweden AB. <http://dx.doi.org/10.1080/00016357.2020.1797159>.

DINARELLO CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**. 1996 Mar 15;87(6):2095-147. PMID: 8630372.

DUNCAN, R. L.; TURNER, C. H.. Mechanotransduction and the functional response of

bone to mechanical strain. **Calcified Tissue International**, [S.L.], v. 57, n. 5, p. 344-358, nov. 1995. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1007/bf00302070>.

FAUL, F.; ERDFELDER, E.; LANG, A.-G.; BUCHNER, A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 175-191, maio 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.3758/bf03193146>.

FERRARIS, S.; CAZZOLA, M.; ZUARDI, L. R.I; OLIVEIRA, P. T. Metal nanoscale systems functionalized with organic compounds. **Nanostructured Biomaterials For Regenerative Medicine**, [S.L.], p. 407-436, 2020. Elsevier.  
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-102594-9.00015-2>.

GADANI, S. P.; CRONK, J. C.; NORRIS, G. T.; KIPNIS, J. IL-4 in the Brain: a cytokine to remember. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 189, n. 9, p. 4213-4219, 1 nov. 2012. The American Association of Immunologists.  
<http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1202246>.

GAMBINI, J.; INGLÉS, M.; OLASO, G.; LOPEZ-GRUESO, R.; BONET-COSTA, V.; GIMENO-MALLENCH, L.; MAS-BARGUES, C.; ABDELAZIZ, K. M.; GOMEZ-CABRERA, M. C.; VINA, J.. Properties of Resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2015, p. 1-13, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/837042>.

GUÉHENNEC, L. Le; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y.. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**, [S.L.], v. 23, n. 7, p. 844-854, jul. 2007. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2006.06.025>.

GIRARD, P. P.; CAVALCANTI-ADAM, E. A.; KEMKEMER, R.; SPATZ, J.P. Cellular chemomechanics at interfaces: sensing, integration and response. **Soft Matter**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 307, 2007. Royal Society of Chemistry (RSC).  
<http://dx.doi.org/10.1039/b614008d>.

GUO, L.; ZHANG, X.; LV, NUAN; WANG, L.; GAN, Jiali; JIANG, Xijuan; WANG, Yijing. Therapeutic Role and Potential Mechanism of Resveratrol in Atherosclerosis:  $\text{tlr4/nf-}\kappa\text{b/hif-1}\alpha$ . **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 2023, p. 1-13, 31 maio 2023. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2023/1097706>.

HEY, Claudia; BOUCHER, Jean-Luc; GOFF, Sandrine Vadon-Le; KETTERER, Gabi; WESSLER, Ignaz; RACKÉ, Kurt. Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N $\omega$ -hydroxy-D,L-indospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 121, n. 3, p. 395-400, maio 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0701143>.

HOLMES, C.; TABRIZIAN, M. Surface Functionalization of Biomaterials. **Stem Cell Biology And Tissue Engineering In Dental Sciences**, [S.L.], p. 187-206, 2015. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-397157-9.00016-3>.

HU, X.; LEAK, R. K.; SHI, Y.; SUENAGA, J.; GAO, Y.; ZHENG, P.; CHEN, J. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. **Nature Reviews Neurology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 56-64, 11 nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.207>.

JONGE, L. T. de; LEEUWENBURGH, Sander C. G.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A.. Organic–Inorganic Surface Modifications for Titanium Implant Surfaces. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 25, n. 10, p. 2357-2369, 29 maio 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-008-9617-0>.

KARTIKASARI, N.; YAMADA, M.; WATANABE, J.; TISKRATOK, W.; HE, X.; KAMANO, Y.; EGUSA, H. Titanium surface with nanospikes tunes macrophage polarization to produce inhibitory factors for osteoclastogenesis through nanotopographic cues. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 137, p. 316-330, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2021.10.019>.

KELLY, A.; HOUSTON, S. A.; SHERWOOD, E.; CASULLI, J.; TRAVIS, Mark A.. Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGF $\beta$ . **Advances In Immunology**, [S.L.], p. 137-233, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ai.2017.01.001>.

Li Y, Feng L, Li G, An J, Zhang S, Li J, Liu J, Ren J, Yang L, Qi Z. Resveratrol prevents ISO-induced myocardial remodeling associated with regulating polarization of macrophages through VEGF-B/AMPK/NF-kB pathway. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jul;84:106508. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106508. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32339921.

LIU, Y.; LIU, Y.; CHEN, H.; YAO, X.; XIAO, Y.; ZENG, X.; ZHENG, Q.; WEI, Y.; SONG, C.; ZHANG, Y. Synthetic Resveratrol Derivatives and Their Biological Activities: a review. **Open Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 05, n. 04, p. 97-105, 2015. Scientific Research Publishing, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4236/ojmc.2015.54006>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D.. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, [S.L.], v. 25,

n. 4, p. 402-408, dez. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

MADDEL M.B.; IBANEZ L.; WAKKACH A.; VRIES T.J.; TETI A.; APPAEAILLY F.; BLIN-WAKKACH C. Immune Function and Diversity of Osteoclasts in Normal and Pathological Conditions. **Front Immunol**. 2019 Jun 19;10:1408. doi: 10.3389/fimmu.2019.01408. PMID: 31275328; PMCID: PMC6594198.

MANTOVANI, A.; A SICA,; SOZZANI, S; ALLAVENA, P; A VECCHI,; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 25, n. 12, p. 677-686, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>.

MAXIMIANO, W. M. A.; MAZUCATO, V. M.; OLIVEIRA, P. T. ; JAMUR, M. C.; OLIVER, C.,. Nanotextured titanium surfaces stimulate spreading, migration, and growth of rat mast cells. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [S.L.], v. 105, n. 8, p. 2150-2161, 19 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.36076>.

MIZUTANI K.; IKEDA K; KAWAI Y; YAMORI Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 1998 Dec 30;253(3):859-63. doi: 10.1006/bbrc.1998.9870. PMID: 9918820.

NAHRENDORF, M.; SWIRSKI, F. K.; AIKAWA, E.; STANGENBERG, L.; WURDINGER, T.; FIGUEIREDO, J.-L.; LIBBY, P.; WEISSLEDER, R.; PITTET, M. J.. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. **The Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 204, n. 12, p. 3037-3047, 19 nov. 2007. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20070885>.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, [S.L.], v. 420, n. 6917, p. 846-852, dez. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01320>.

NIELSEN, M, C.; GANTZEL, R. H.; CLÀRIA, J.; TREBICKA, J.; MØLLER, Holger J.; GRØNBÆK, H.. Macrophage Activation Markers, CD163 and CD206, in Acute-on-Chronic Liver Failure. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 1175, 9 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9051175>.

OLTEAN-DAN, D.; DOGARU, G.-B.; JIANU, E.-M.; RIGA, S.; TOMOAIACOTISEL, M.; MOCANU, A.; BARBU-TUDORAN, L.; TOMOAIAG. Biomimetic Composite Coatings for Activation of Titanium Implant Surfaces: methodological approach and in vivo enhanced osseointegration. **Micromachines**, [S.L.], v. 12, n. 11, p. 1352, 31 out. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/mi12111352>.

OLIVEIRA, P. T. ; NANJI, A.. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic

cells. **Biomaterials**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 403-413, fev. 2004. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00539-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00539-8).

PACE-ASCIAC, C. R.; HAHN, S.; DIAMANDIS, E. P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D. M.. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. **Clinica Chimica Acta**, [S.L.], v. 235, n. 2, p. 207-219, mar. 1995. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981\(95\)06045-1](http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981(95)06045-1).

PANDEY, C.; ROKAYA, D.; BHATTARAI, B. P.. Contemporary Concepts in Osseointegration of Dental Implants: a review. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2022, p. 1-11, 14 jun. 2022. Hindawi Limited.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2022/6170452>.

PERVAIZ, S.. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. **The Faseb Journal**, [S.L.], v. 17, n. 14, p. 1975-1985, nov. 2003. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1096/fj.03-0168rev>.

PITCHAI, M.; IPE, D.; TADAKAMADLA, S.; HAMLET, S.. Titanium Implant Surface Effects on Adherent Macrophage Phenotype: a systematic review. **Materials**, [S.L.], v. 15, n. 20, p. 7314, 19 out. 2022. MDPI AG.  
<http://dx.doi.org/10.3390/ma15207314>.

PITCHAI, M. S.; IPE, D. S.; HAMLET, S. The Effect of Titanium Surface Topography on Adherent Macrophage Integrin and Cytokine Expression. **Journal Of Functional Biomaterials**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 211, 11 abr. 2023. MDPI AG.  
<http://dx.doi.org/10.3390/jfb14040211>.

PULEO, D. Understanding and controlling the bone–implant interface. **Biomaterials**, [S.L.], v. 20, n. 23-24, p. 2311-2321, dez. 1999. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00160-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00160-x).

REGE S.D.; GEETHA T.; GRIFFIN G.D.; BRODERICK T.L.; BABU J.R. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. **Front Aging Neurosci**. 2014 Sep 11;6:218. doi: 10.3389/fnagi.2014.00218. PMID: 25309423; PMCID: PMC4161050.

REGGIO, C.; BARBERI, J.; FERRARIS, S.; SPRIANO, S.. Functionalization of Ti6Al4V Alloy with Polyphenols: the role of the titanium surface features and the addition of calcium ions on the adsorption mechanism. **Metals**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 1347, 27 jul. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/met13081347>.

SCANNAVINO, R. C. P.; RICCUCCI, G.; FERRARIS, S.; DUARTE, G. L. C.; OLIVEIRA, P. T.; SPRIANO, S. Functionalization with Polyphenols of a Nano-Textured Ti Surface through a High-Amino Acid Medium: a chemical • physical and biological characterization. **Nanomaterials**, [S.L.], v. 12, n. 17, p. 2916, 24 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano12172916>. SHIRAZI, Sajjad et al. Evaluation of nanoscale versus hybrid micro/nano surface topographies for endosseous implants. *Acta Biomaterialia*, v. 173, p. 199-216, 2024.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAEILI, S.-A.; MARDANI, F.; SEIFI, B.; MOHAMMADI, A.; AFSHARI, J. T.; SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 233, n. 9, p. 6425-6440, mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.26429>.

SICA, Antonio; MANTOVANI, Alberto. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 122, n. 3, p. 787-795, 1 mar. 2012. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci59643>.

SOUZA, J. C.M.; SORDI, M. B.; KANAZAWA, M.; RAVINDRAN, S.; HENRIQUES, B.; SILVA, F. S.; APARICIO, C.; COOPER, L. F.. Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 94, p. 112-131, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.045>.

SRIVASTAVA R.K.; DAR H.Y.; MISHRA P.K.; Immunoporosis: Immunology of Osteoporosis-Role of T Cells. **Front Immunol**. 2018 Apr 5;9:657. doi: 10.3389/fimmu.2018.00657. PMID: 29675022; PMCID: PMC5895643.

STRIZOVA, Z.; BENESOVA, I.; BARTOLINI, R.; NOVYSEDLAK, R.; CECRDLOVA, E.; FOLEY, L. K.; STRIZ, I. M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? **Clinical Science**, [S.L.], v. 137, n. 15, p. 1067-1093, ago. 2023. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/cs20220531>.

TAKAOKA, M. Resveratrol, a new phenolic compound, from *Veratrum grandiflorum*. *Nippon Kagaku Kaishi*, v. 60, n. 11, p. 1090-100, 1939.

THOMAS, V.; DEAN, D.; VOHRA, Y.. Nanostructured Biomaterials for Regenerative Medicine. **Current Nanoscience**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 155-177, 1 ago. 2006. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1573413710602030155>.

VARIOLA, F.; YI, J.-H.; RICHERT, L.; WUEST, J. D.; ROSEI, F.; NANCI, A.. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. **Biomaterials**, [S.L.], v. 29, n. 10, p. 1285-1298, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.11.040>. VARIOLA, Fabio et al. Nanoscale

surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale*, v. 3, n. 2, p. 335-353, 2011.

VETRONE, F.; VARIOLA, F.; OLIVEIRA, P.T.; ZALZAL, S. F.; YI, J.-H.; SAM, J.; BOMBONATO-PRADO, K. F.; SARKISSIAN, A.; PEREPICHKA, D. F.; WUEST, J. D.. Nanoscale Oxidative Patterning of Metallic Surfaces to Modulate Cell Activity and Fate. **Nano Letters**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 659-665, 21 jan. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/nl803051f>.

WANG, X.; LI, Y.; FENG, Y.; CHENG, H.; LI, D.. Macrophage polarization in aseptic bone resorption around dental implants induced by Ti particles in a murine model. **Journal Of Periodontal Research**, [S.L.], v. 54, n. 4, p. 329-338, 11 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jre.12633>. XU, Wei-Chang et al. Nanotubular TiO<sub>2</sub> regulates macrophage M2 polarization and increases macrophage secretion of VEGF to accelerate endothelialization via the ERK1/2 and PI3K/AKT pathways. *International journal of nanomedicine*, p. 441-455, 2019.

XU Z.; GU Y.; WANG C.Z.; JIN Y., WEN X.M.; MA J.C.; TANG L.J.; MAO Z.W.; QIAN J.; LIN J. The M2 macrophage marker *CD206*: a novel prognostic indicator for acute myeloid leukemia. **Oncoimmunology**. 2019 Nov 3;9(1):1683347. doi: 10.1080/2162402X.2019.1683347. PMID: 32002295; PMCID: PMC6959428.

YANG, R.; YAN, Y.; WU, Z.; WEI, Y.; SONG, H.; ZHU, L.; ZHAO, C.; XU, Na; FU, J.; HUO, K.. Resveratrol-loaded titania nanotube coatings promote osteogenesis and inhibit inflammation through reducing the reactive oxygen species production via regulation of NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 131, p. 112513, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2021.112513>.

YANG, Y.; LI, S.; YANG, Q.; SHI, Yu; Z., M.; LIU, Y.; CHEN, F.; SONG, G.; XU, H.; WAN, T.. Resveratrol Reduces the Proinflammatory Effects and Lipopolysaccharide- Induced Expression of HMGB1 and TLR4 in RAW264.7 Cells. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 33, n. 5, p. 1283-1292, 2014. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000358696>.

YANG, Y.; BAZHIN, A. V.; WERNER, J.; KARAKHANOVA, S.. Reactive Oxygen Species in the Immune System. **International Reviews Of Immunology**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 249-270, 25 abr. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/08830185.2012.755176>. YI, Chin-Ok et al. Resveratrol activates AMPK and suppresses LPS-induced NF- $\kappa$ B-dependent COX-2 activation in RAW 264.7 macrophage cells. *Anatomy & cell biology*, v. 44, n. 3, p. 194-203, 2011.

YUNNA, C.; MENGROU, Hu; LEI, W.; WEIDONG, C.. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 877, p. 173090, jun.

2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>.

ZUARDI, L. R.; SILVA, C. L. A.; REGO, E. M.; CARNEIRO, G. V.; SPRIANO, S.; NANJI, A.; OLIVEIRA, P. T. Influence of a Physiologically Formed Blood Clot on Pre-Osteoblastic Cells Grown on a BMP-7-Coated Nanoporous Titanium Surface. **Biomimetics**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 123, 16 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomimetics8010123>.