

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

LETÍCIA RABELO DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS
SOBRE DISCOS DE TITÂNIO SUBMETIDOS À ALCALINIZAÇÃO COM
HIDRÓXIDO DE SÓDIO E FUNCIONALIZAÇÃO COM COLÁGENO
TIPO I

RIBEIRÃO PRETO
2024

LETÍCIA RABELO DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS
SOBRE DISCOS DE TITÂNIO SUBMETIDOS À ALCALINIZAÇÃO COM
HIDRÓXIDO DE SÓDIO E FUNCIONALIZAÇÃO COM COLÁGENO
TIPO I

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. Fernanda Gonçalves Basso

Ribeirão Preto
2024

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

SANTOS, Letícia Rabelo dos, 1996-
S237a Avaliação da resposta de osteoblastos cultivados sobre discos de
titânio submetidos à alcalinização com hidróxido de sódio e
funcionalização com colágeno / Letícia Rabelo dos Santos. – Ribeirão
Preto, 2024.
37 f.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Fernanda Gonçalves Basso.

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

1. Titânio. 2. Alcalinização. 3. Colágeno. 4. Osteoblastos.
II. Título.

CDD 617.6

LETÍCIA RABELO DOS SANTOS

“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS SOBRE DISCOS DE TITÂNIO ALCALINIZADOS COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO E FUNCIONALIZADOS COM COLÁGENO TIPO I”

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

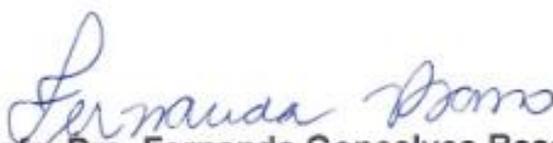
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso Lombardi

Área de concentração: Implantodontia

Data de defesa: 04 de março de 2024

Resultado: **APROVADA**

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso Lombardi

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



Profa. Dra. Mariana Lima da Costa Valente

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



Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Pesquisadora do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
meus irmãos,
meu padrinho, minhas madrinhas,
meus/minhas tios(as) e
meus avós,
por sempre me apoiarem neste sonho.*

*Dedico também à minha eterna amiga, Franciele
Pupin. Esta conquista é para você,
obrigada por tanto,
mesmo aí de cima sempre
se fazer presente.*

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, agradeço a **Deus** por tornar esse sonho realidade e por estar comigo o tempo todo me dando força e sabedoria para seguir em frente.*

*Agradeço também à **minha família de forma geral**, por estarem ao meu lado em todo momento e por não medirem esforços e enfrentar os desafios juntamente comigo, para me proporcionar essa conquista; por estarem presentes em minhas necessidades, pelos conselhos e rezas, por acreditarem em mim a cada momento e a cada passo.*

*À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da sua Reitora **Profa. Dra. Suzulei de Castro França**, personalidade constante e pioneira na educação nacional. Obrigada pela oportunidade de poder concretizar mais esse sonho.*

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

Aos demais professores, que não apenas transmitiram conhecimento nas disciplinas, mas também enriqueceram minha formação profissional e pessoal, expresso minha sincera gratidão pelas oportunidades e pelo impacto significativo que tiveram em meu crescimento.

*Agradeço a minha orientadora **Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso** por toda paciência, dedicação e carinho comigo. Por sempre acreditar que estou pronta, que consigo e que sou capaz, até mesmo quando eu não confiei e confio. Agradeço por todo incentivo e por me acalmar com esse jeito seu todo especial. Gratidão eterna por você.*

*À doutoranda **Isabela Massaro Ribeiro**, por toda a ajuda no desenvolvimento do projeto.*

*À minha amiga **Carolina Martinelli**, por estar comigo nesse período de mestrado, me dando força e motivação.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

*Aos Laboratórios de Patologia Experimental e Biomateriais e de Biologia Óssea, do Departamento de Fisiologia e Patologia da **Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP**, pela oportunidade de realizar a pesquisa.*

GRATIDÃO!!!

RESUMO

As modificações e funcionalizações das superfícies de implantes têm demonstrado efeitos promissores na aceleração da resposta dos tecidos peri-implantares. O aumento da rugosidade superficial dos implantes resulta em aumento da superfície de contato com o tecido receptor e maior adesão e espraiamento das células ósseas. O processo de alcalinização superficial com hidróxido de sódio (NaOH) promove um aumento da rugosidade da superfície do titânio e favorece a adsorção de moléculas orgânicas. O colágeno tipo I compõe 90% da matriz orgânica do tecido ósseo e pode acelerar a adesão e diferenciação dos osteoblastos. Neste estudo, foi avaliado o efeito da funcionalização de discos de titânio com colágeno tipo I (polidos ou alcalinizados) sobre a resposta de osteoblastos. Os discos de titânio foram manualmente polidos e submetidos à alcalinização com NaOH 5 mol/L por 24 h a 60°C, seguido de análise da topografia e rugosidade superficial. A seguir, foram submetidos à funcionalização com colágeno tipo I (1 mg/mL) por 4 h a 37°C, seguido do cultivo dos osteoblastos (SaOs-2). Após 7 dias, foram determinadas a adesão celular sobre os substratos, a viabilidade celular, a atividade de fosfatase alcalina (ALP) e a expressão gênica de marcadores da diferenciação osteogênica. Os dados de rugosidade superficial, viabilidade, atividade de ALP e expressão gênica foram analisados estatisticamente por meio dos testes de ANOVA a dois critérios e Tukey ($\alpha=0,05$), enquanto os dados de topografia superficial e adesão celular foram analisados qualitativamente. Todos os parâmetros avaliados foram aumentados para as superfícies submetidas à alcalinização, sendo que a associação dos dois tratamentos (alcalinização com NaOH e funcionalização com colágeno tipo I) promoveu resultados ainda melhores, com aumento significativos da adesão celular, viabilidade, atividade de ALP e expressão dos marcadores avaliados. Portanto, a alcalinização com NaOH e a funcionalização do titânio com colágeno foram efetivas na estimulação da resposta de osteoblastos. A associação de ambos os tratamentos ofereceu as melhores condições para a resposta destas células. Estas modificações podem ser estratégias promissoras na aceleração do reparo peri-implantar ósseo.

Palavras-chave: Alcalinização. Colágeno. Funcionalização. Osteoblastos. Titânio

ABSTRACT

The modification and functionalization of implants surface have demonstrated promising effects on the acceleration on the response of peri-implant tissues. The increased surface roughness of implants results in higher surface contact to the receptor tissue and higher adhesion and spreading of bone cells. The alkalization process with sodium hydroxide (NaOH) promotes an increase in surface roughness on titanium and favors the adsorption of organic molecules. Collagen type I represents 90% of organic matrix of bone tissue and may accelerate the adhesion and differentiation of osteoblasts. This investigation evaluated the effect of functionalization of titanium discs with collagen type I (polished or alkali-treated) on the response of osteoblasts. Titanium discs were manually polished and subjected to alkalization with NaOH at 5mol/L for 24 hours at 60°C, followed by determination of surface topography and roughness. Then, they were submitted to functionalization with collagen type I (1 mg/mL) for 4 hours at 37°C, followed by osteoblasts seeding (SaOs-2). After 7 days, cell adhesion onto each substrate was evaluated as also cell viability, alkaline phosphatase (ALP) activity and gene expression of osteogenic markers. Data of surface roughness, viability, ALP activity and gene expression were analyzed by ANOVA two-way and Tukey tests ($\alpha=0.05$), while data on surface topography and cell adhesion were qualitatively evaluated. All parameters were increased for the titanium surface subjected to alkalization and the combination of the two protocols (alkalination and functionalization with collagen type I) promoted the better results, with higher cell adhesion, viability, ALP activity and gene expression. Therefore, the alkalization of titanium surfaces with NaOH and the functionalization of these surfaces with collagen were effective strategies on stimulating osteoblasts response. The combination of both demonstrated to be the best conditions to cells response. These modifications may be suitable strategies to accelerate bone peri implant repair.

Keywords: Alkalization. Collagen. Functionalization. Osteoblasts. Titanium

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	PROPOSIÇÃO	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	13
3.2	OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO	13
3.3	ALCALINIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO	14
3.4	ANÁLISE DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE SUPERFICIAL	15
3.5	FUNCIONALIZAÇÃO COM COLÁGENO TIPO I	16
3.6	CULTURA DE OSTEOLASTOS	17
3.7	ANÁLISE DA ADESÃO DOS OSTEOLASTOS	18
3.8	VIABILIDADE CELULAR	19
3.9	ATIVIDADE DE ALP	19
3.10	EXPRESSÃO GENICA DE MARCADORES	20
3.11	ANÁLISE DOS RESULTADOS	22
4	RESULTADOS	23
4.1	TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE SUPERFICIAL	23
4.2	ADESÃO CELULAR	24
4.3	VIABILIDADE CELULAR	25
4.4	ATIVIDADE DE ALP	26
4.5	EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES	27
5	DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O implante começou ser utilizado na década de 1960 quando Branemark desvendou o processo de osseointegração, o qual ocorre a partir da inter-relação entre o implante e o tecido ósseo alveolar receptor (BRANEMARK, 1983). Em seguida à instalação do implante, o processo de reparo se inicia por meio da formação de tecido de granulação e do coágulo, responsáveis por preservar o espaço peri-implantar; posteriormente, as células osteogênicas se diferenciam em osteoblastos e secretam matriz extracelular ao redor do implante. Essas células são procedentes de células perivasculares, presentes ao redor das paredes dos vasos sanguíneos, com a finalidade de produzir tecido ósseo lamelar no período da remodelação óssea e formação de tecido ósseo maduro (MENDES; DAVIES, 2016; ZENG et al., 2019 apud SANTOS, 2021).

O titânio (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 (TiO₂) quando o titânio 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; SOUZA et al., 2019; OLTEAN-DAN et al., 2021).

Apesar de ser considerado biocompatível, o titânio apresenta-se como um elemento não fisiológico. Sendo assim, o revestimento da superfície do implante com componentes do tecido ósseo (materiais bioativos) poderia estabelecer uma transição fisiológica entre o osso e a superfície do implante, de modo a aprimorar a fixação, a proliferação e a diferenciação das células osteogênicas, assim acelerando o processo de osseointegração (OLTEAN-DAN et al., 2002; DE JONGE et al., 2008).

A adesão e a proliferação dos osteoblastos são processos essenciais para a osseointegração de implantes, definida como o contato osso-implante, capaz de suportar carga funcional (GRONOWICZ; McCARTHY, 1996). Sendo assim, diferentes fatores locais e sistêmicos podem influenciar o reparo peri-implantar como a quantidade e qualidade do tecido ósseo receptor, condições de saúde oral do paciente e saúde geral do mesmo, considerando hábitos, uso de medicamentos, doenças crônicas e comorbidades (KULLAR; MILLER, 2019). Outros fatores, inerentes aos implantes também são importantes para a resposta peri-implantar. Entre estes fatores, é possível citar a composição e a topografia dos substratos, que apresenta influência direta na adesão, espalhamento e diferenciação celular (YU; WALSH; WEI, 2013).

Diversos estudos apontam que as superfícies de maior rugosidade facilitam a adesão, diferenciação e metabolismo celular, além de resultar em aceleração do processo de osseointegração (WENNERNBERG et al., 2009). As modificações de superfície do implante têm a capacidade de melhorar a osteocondução e osteoindução e aumentar a deposição e mineralização da matriz de colágeno (TRENTO et al., 2020). Desse modo, a fim de melhorar o contato osso-implante, diversas modificações de superfícies estão sendo estudadas como, o jateamento com partículas abrasivas (óxido de alumínio) que resulta em uma superfície rugosa, melhorando a osseointegração, já que a rugosidade aumenta a área de contato entre o tecido ósseo e o implante. Já o polimento mecânico torna a superfície mais uniforme, criando uma base adequada para a ancoragem de materiais. O eletropolimento, por sua vez, é um processo eletroquímico que favorece a resistência do implante à corrosão. Por meio do tratamento com lasers de alta potência, o implante tem a sua superfície modificada por irradiação por meio de feixes de laser produzindo erosões e uma superfície rugosa. A oxidação anódica forma uma camada de óxido na superfície do implante, melhorando a durabilidade do implante. Por fim, os tratamentos ácidos e alcalinos modificam a superfície por meio de reações químicas, removendo impurezas e formando rugosidades (SILVA et al., 2016). Dentre elas, a alcalinização com o hidróxido de sódio tem demonstrado efeitos positivos, aumentando a rugosidade superficial, além de favorecer a adsorção de moléculas bioativas, o que permitiria a aplicação/ liberação de proteínas nas superfícies do material (NISHIGUCHI et al., 2003; TUGULU et al., 2010; CARMARGO et al., 2017)

Em estudos anteriores sobre a alcalinização na superfície do titânio, foram demonstrados resultados como alteração da topografia com aumento da rugosidade, melhorando a hidrofiliabilidade e molhabilidade do material, aumentando, conseqüentemente, a adesão, espalhamento, diferenciação celular e metabolismo celular (atividade de fosfatase alcalina (ALP - do inglês *alkaline phosphatase* e síntese de proteína) (NISHIGUCHI et al., 2003; TUGULU et al., 2010; CARMARGO et al., 2017). Quanto maior a similaridade da superfície do implante com tecido ósseo, melhor a resposta dos osteoblastos e a formação de matriz óssea peri-implantar (KHANG et al., 2008).

O termo funcionalizar significa aumentar o potencial biológico de um determinado material, de forma a acelerar a resposta tecidual. Neste contexto, uma das estratégias que podem ser utilizadas para tal funcionalização é a aplicação de moléculas inerentes do tecido ósseo, como colágeno, que corresponde a 90% do componente orgânico da matriz extracelular óssea (YU; WALSH; WEI, 2013). A superfície modificada do implante pode favorecer a deposição

de matriz extracelular óssea (GEIBLER et al., 2000). O colágeno tipo I é um dos principais componentes orgânicos da matriz extracelular óssea e auxilia na diferenciação, adesão e proliferação das atividades celulares em superfícies de biomateriais. O colágeno tipo I se liga as integrinas 11 e 21, as quais facilitam a diferenciação e fixação de células osteoblásticas, além de servir como andaime mineral e acelerar a expressão do fenótipo da célula óssea (GEIBLER et al., 2000). Portanto, o revestimento da superfície de titânio com colágeno tipo I pode facilitar a adesão e o espalhamento de osteoblastos por meio de integrinas. Segundo o estudo de Gleiber e colaboradores (2020), superfícies tratadas com colágeno apresentaram aumento da adesão celular em cerca de 30%.

Estudos *in vitro* que avaliaram a funcionalização de superfícies de titânio com colágeno demonstraram aceleração no tempo de adesão celular sobre a superfície do implante, aumento do grau de espalhamento das células osteoblásticas e aumento da síntese de osteopontina (ROEHLECKEA et al., 2000). Além disso, estudo anterior *in vivo* demonstrou que a aplicação de um hidrogel de colágeno gerou a formação de ligamento periodontal independente da aplicação de BMP (do inglês - *bone morphogenetic protein*) (proteínas morfogenéticas ósseas). Ademais, a maior parte da estrutura de colágeno desapareceu em 4 semanas e raramente foram observadas células inflamatórias e reabsorção radicular, tendo como resultado uma boa biocompatibilidade e sendo um fator essencial para suprir as células do ligamento periodontal e para regeneração (KATO et al., 2015).

Algumas condições sistêmicas podem prejudicar o reparo periimplantar. As doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), podem afetar a função dos osteoblastos e diminuir a capacidade de adesão óssea ao implante. Ademais, a inflamação crônica associada às doenças autoimunes pode prejudicar a cicatrização e a formação de osso ao redor do implante (COSTA et al., 2019). A osteoporose é caracterizada pela diminuição da densidade óssea e fragilidade dos ossos, qualidade e quantidade do osso disponível para a ancoragem do implante são afetadas negativamente pela osteoporose (AZEEZ, 2023). Além disso, estes pacientes frequentemente fazem uso de medicamentos antirreabsortivos, que têm apresentado efeitos deletérios para o tecido ósseo, incluindo o reparo peri-implantar. A diabetes mellitus reduz a vascularização local e a função dos osteoblastos, prejudicando a formação de osso ao redor do implante (WANG et al., 2021). Já as doenças cardiovasculares podem afetar indiretamente a osseointegração, pois a circulação sanguínea inadequada pode comprometer a nutrição e oxigenação dos ossos, afetando a formação óssea ao redor do implante (AZEEZ, 2023). Portanto, a funcionalização do titânio com o colágeno associado a alcalinização, pode

ser uma alternativa promissora para acelerar o reparo periimplantar, promovendo uma melhora na resposta biológica do tecido ósseo ao implante, principalmente visando casos de desafios no reparo ósseo.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da modificação de superfície de titânio por meio de alcalinização com NaOH e/ ou funcionalização com colágeno tipo I no metabolismo de osteoblastos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o efeito da modificação de superfície de titânio por meio de alcalinização com NaOH e/ ou funcionalização com colágeno tipo I em relação à:

- Adesão de osteoblastos por meio de microscopia de fluorescência;
- Viabilidade de osteoblastos por meio do ensaio de PrestoBlue;
- Atividade de fosfatase alcalina por meio do ensaio de ponto final com timolftaleína;
- Expressão gênica de marcadores de diferenciação osteogênica por meio de PCR em tempo real (qPCR)

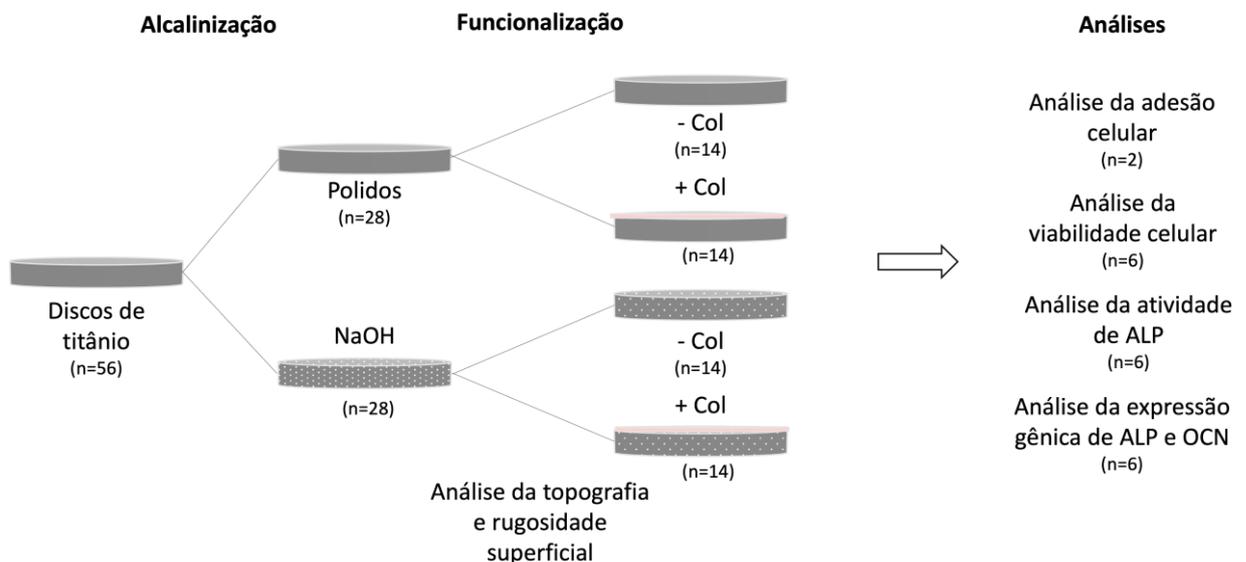
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Esta investigação foi realizada a partir de modelo *in vitro* visando simular a interação do implante com células do tecido ósseo após sua instalação. Desta forma, as células foram cultivadas diretamente sobre os discos de titânio submetidos a diferentes protocolos de tratamento de superfície.

Os fatores do estudo foram: superfícies de titânio polidas, funcionalizadas ou não com o colágeno tipo I, e superfície de titânio submetidas ao tratamento com hidróxido de sódio e/ ou funcionalizada com colágeno tipo I. As variáveis de respostas incluíram avaliação qualitativa da rugosidade e topografia superficiais, e da adesão dos osteoblastos. Avaliação quantitativa da viabilidade celular, da atividade de fosfatase alcalina e da expressão gênica de marcadores de diferenciação osteogênica (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental utilizado para o desenvolvimento do estudo.



Fonte: autor

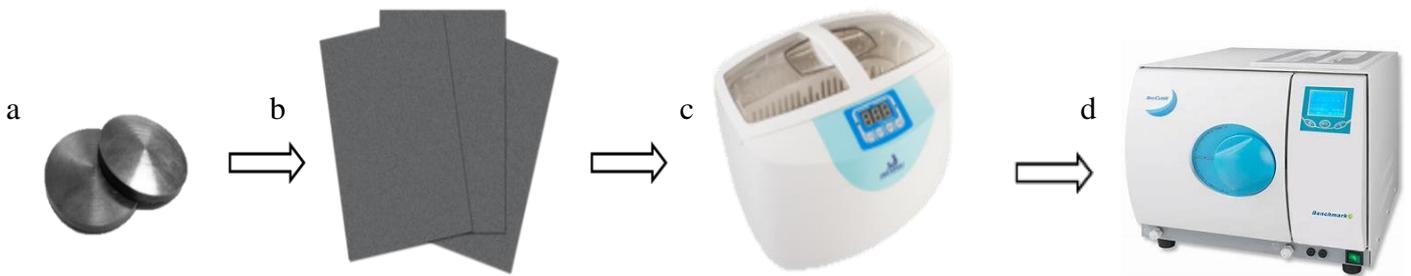
3.2 OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO

Discos de titânio de oito mm de diâmetro e dois mm de espessura comercialmente puros (grau IV) 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, de granulações

400, 600 e 1200 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, BR). Foram lixados em 10 movimentos no formato infinito com cada lixa na superfície dos discos, nas duas faces.

Após serem lixados, os mesmos foram submetidos à limpeza para eliminação de fragmentos resíduos e material orgânico superficiais, seguindo o protocolo: imersão dos discos em tubos Falcon de 50 mL contendo acetona PA por 15 min em ultrassom; imersão dos discos em tubos Falcon de 50 mL contendo etanol 70% por 15 min em ultrassom; imersão dos discos em tubos de Falcon de 50 mL contendo água destilada por 15 min em ultrassom; lavagem abundante com água destilada e esterilizados em autoclave (CARDOSO et al., 2023; PANSANI et al., 2023) (Figura 2).

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) esterilizados em autoclave.



Fonte: autor

3.3 ALCALINIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO

O processo de alcalinização foi realizado por meio de imersão dos discos em solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 5 mol/L por 24 h a 60°C. A seguir, os discos foram lavados em água destilada e secos em bancada a temperatura ambiente (25°C) (VILA REAL et al., 2021) (Figura 3).

Figura 3. (a) Hidróxido de sódio (NaOH) (b) discos de titânio submersos em solução aquosa de NaOH 5 mol/L e incubadas a 60°C por 24 h



Fonte: autor

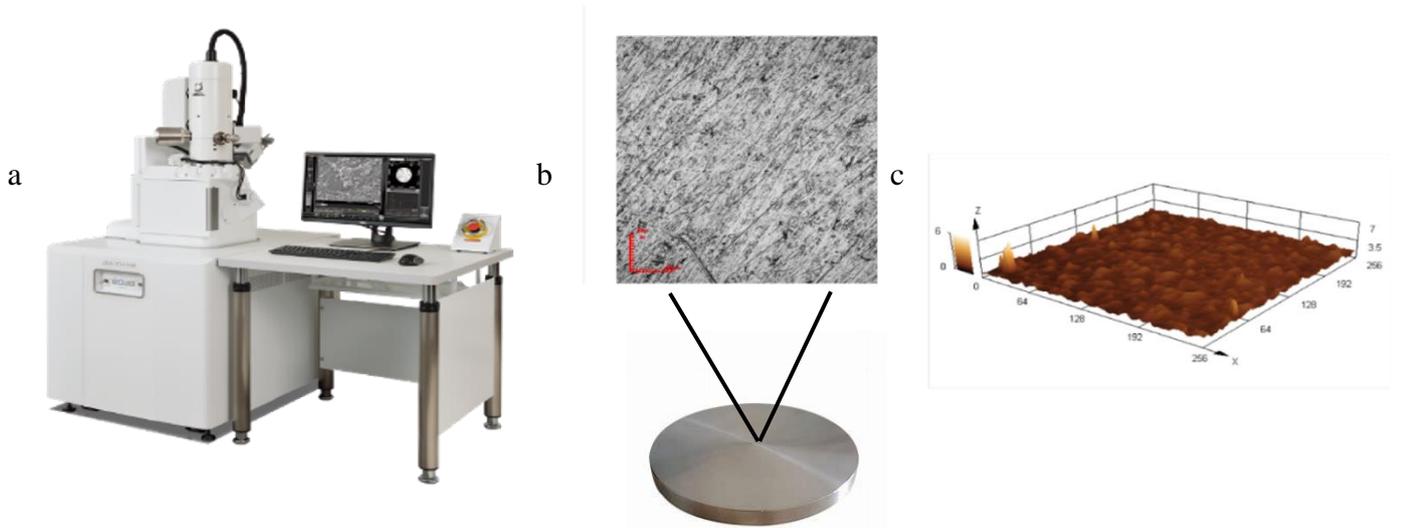
3.4 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE SUPERFICIAL

A topografia e a rugosidade superficial dos discos de titânio polidos e alcalinizados foram determinadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV; Inspect Scanning Electron Microscope-S50, FEI, Hillsboro, OR, EUA), associada análise em *software ImageJ*. (VILA REAL et al., 2022; MOURA et al., 2023).

A rugosidade média de cada superfície foi calculada a partir da medida da rugosidade de cinco áreas lineares para cada amostra (n=6). A média destas medidas foi considerada como rugosidade superficial da amostra (Figura 4).

Previamente aos procedimentos em cultura de células os discos foram esterilizados em autoclave.

Figura 4. Avaliação da topografia e rugosidade superficiais por meio de MEV (a) Microscopia Eletrônica de Varredura (b,c) avaliação da rugosidade superficial dos discos de Ti.

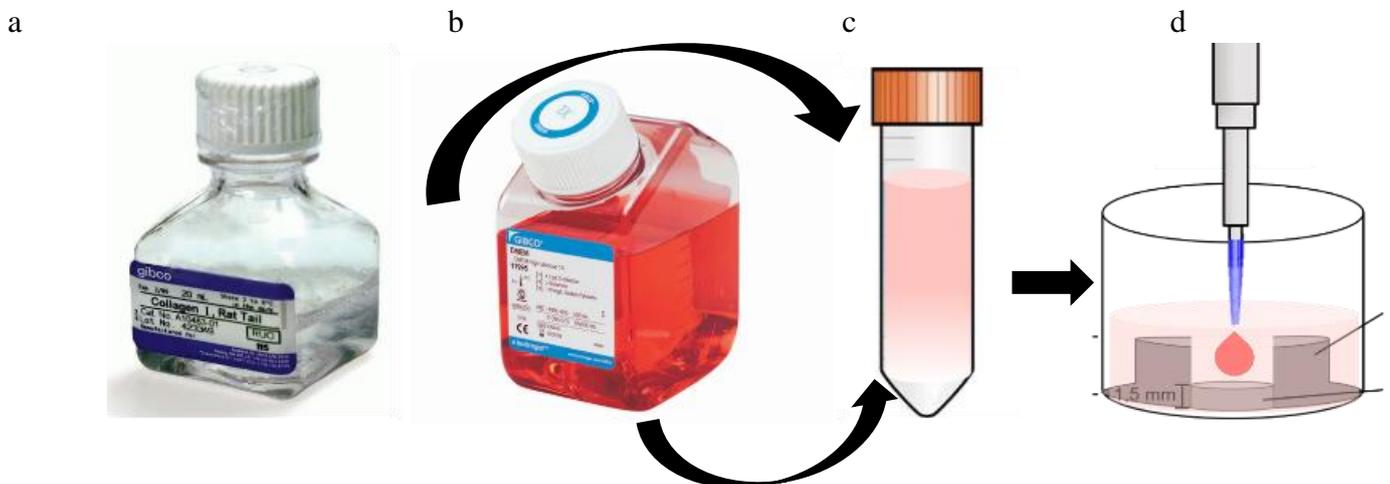


Fonte: autor

3.5 FUNCIONALIZAÇÃO COM COLÁGENO TIPO I

O procedimento de funcionalização dos discos de titânio com colágeno tipo I foi realizado a partir do recobrimento da superfície do disco com colágeno tipo I (1 mg/mL – Rat tail collagen- Gibco, Carlsbad, CA, EUA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) livre de soro fetal bovino (SFB – Gibco). Após esse recobrimento, os discos foram armazenados em incubadora por quatro horas (Figura 5).

Figura 5. Representação da funcionalização da superfície de titânio por meio da aplicação de colágeno tipo I (a) solução colágeno tipo I (b) meio de cultura livre de SFB (c) solução de colágeno tipo I (1 mg/mL) (d) aplicação da solução de colágeno tipo I sobre o disco.



Fonte: autor

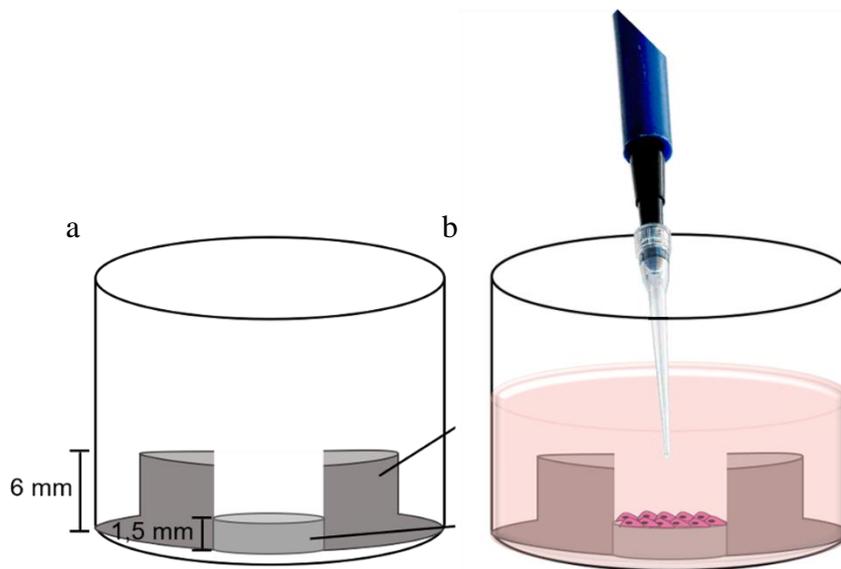
3.6 CULTURA DE OSTEÓBLASTOS

Para este estudo, foram selecionados osteoblastos humanos da linhagem imortalizada SaOs-2 (ATCC# HTB85). Os osteoblastos foram mantidos em meio de cultura DMEM, contendo solução 1% de solução antibiótica (Pen/Strep solution -Gibco) e suplementado com 10% de soro fetal bovino, em incubadora (37 °C e 5% CO₂). Essas células foram subcultivadas utilizando solução de tripsina/EDTA (Gibco) até a obtenção do número necessária para a realização dos experimentos (aproximadamente 2 x 10⁴ células/disco). (BASSO et al., 2020).

Previamente ao cultivo celular, os discos foram alocados em placas de cultura de células de 24 compartimentos, em conjunto com dispositivos metálicos que fixaram os discos na parte central do compartimento e vedaram o fundo da placa, garantindo que as células permanecessem aderidas apenas aos discos.

Após adição de 1 mL de meio de cultura completo, as células foram cultivadas sobre os discos. A seguir, foram mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ por sete dias (Figura 6).

Figura 6. (a) posicionamento dos discos e dispositivos metálicos (b) cultivo dos osteoblastos sobre os discos de titânio.

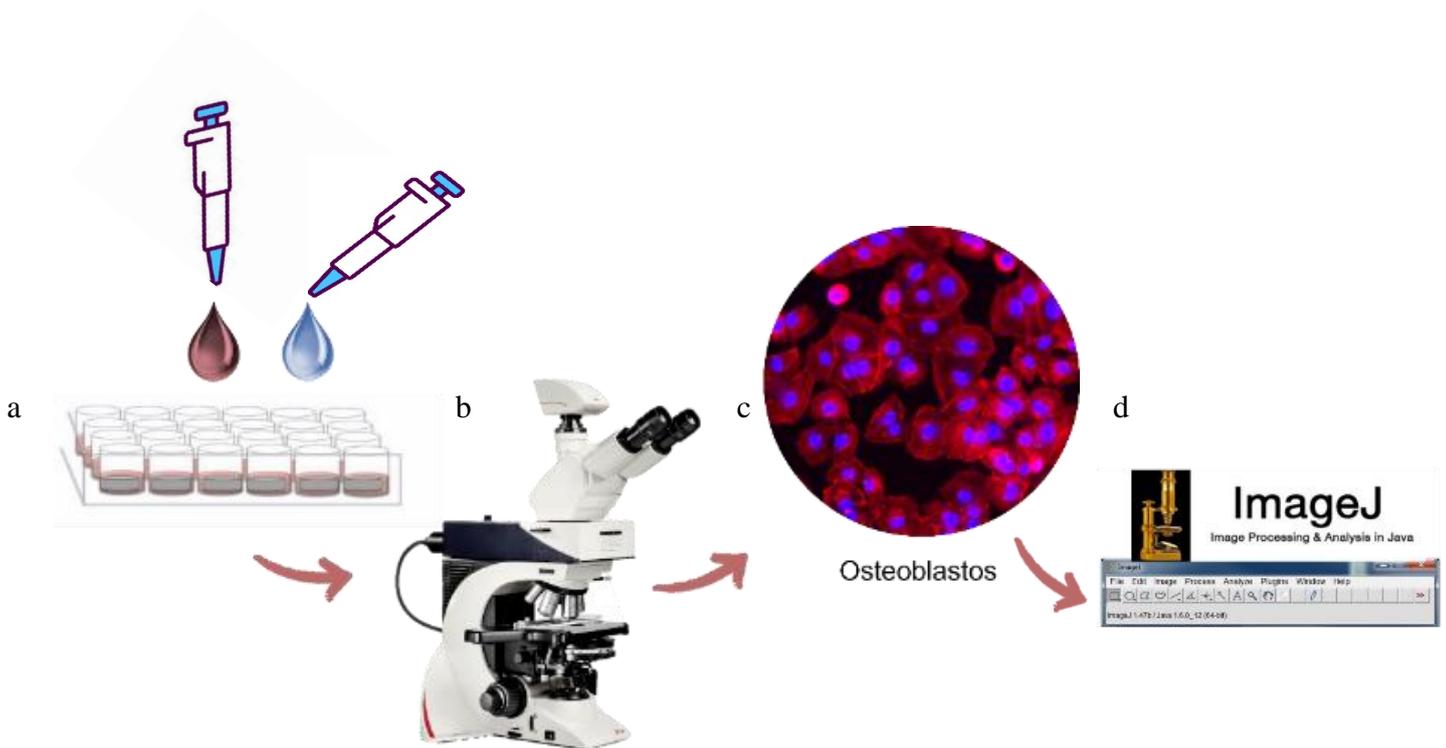


Fonte: autor

3.7 ANÁLISE DA ADESÃO DOS OSTEÓBLASTOS ÀS DIFERENTES SUPERFÍCIES

A adesão dos osteoblastos às diferentes superfícies foi determinada por meio de microscopia de fluorescência, utilizando um marcador de citoesqueleto (Actin Red, Invitrogen 650nm) e um intercalante de DNA (Hoeschst, Invitrogen) (n=2). As células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 min, seguido de lavagem em PBS 1X, permeabilização com Triton X-100 (0,1% - Sigma-Aldrich) e incubação com Actin Red por 30 min. Em seguida, as células foram novamente lavadas com tampão fosfato e submetidas à marcação nuclear com Hoechst (1:5000) por 15 min (CARDOSO et al., 2023). As amostras foram submetidas à análise qualitativa, considerando a densidade e o espreadimento celular, por meio do *software ImageJ* (Figura 7).

Figura 7. (a) Aplicação do protocolo para adesão dos osteoblastos (b) microscópio de fluorescência (c) análise da adesão de osteoblastos (d) *software ImageJ*

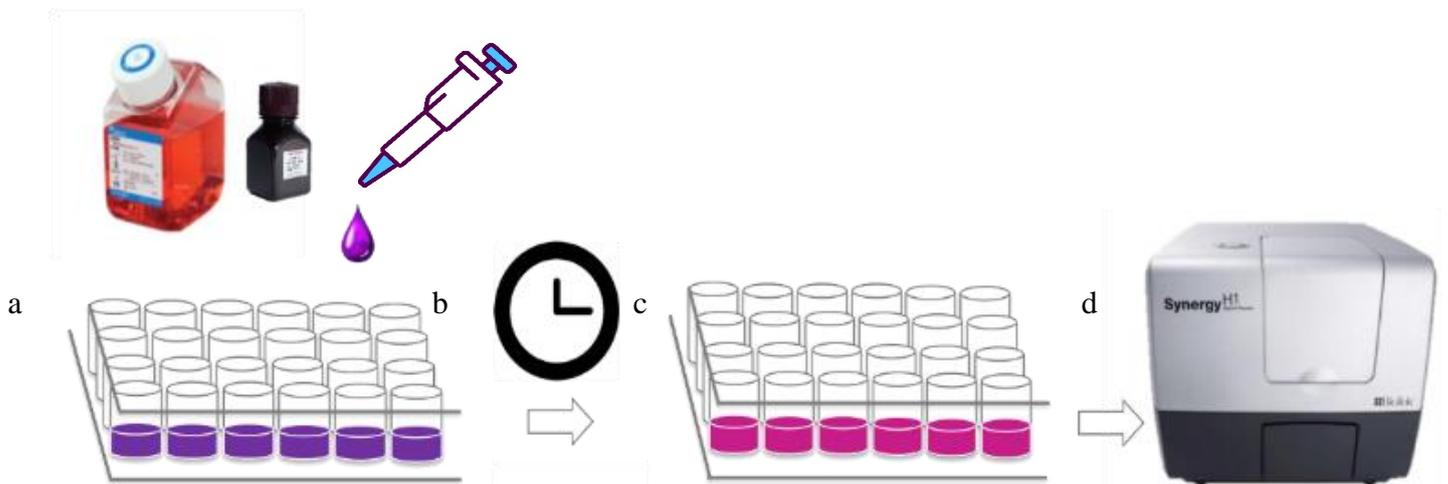


Fonte: autor

3.8 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade dos osteoblastos aderidos às diferentes superfícies foi determinada por meio do teste de prestoBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O ensaio de prestoBlue avalia a viabilidade celular por meio da conversão do reagente resazurina em resorufina, que resulta em uma mudança de cor pronunciada, diretamente proporcional ao metabolismo mitocondrial. Para tanto, as células foram incubadas em solução de prestoBlue 10% em DMEM livre de SFB, por uma hora a 37 °C e 5% de CO₂, seguido da determinação da intensidade de fluorescência da solução, por meio de fluorímetro (Synergy H1 Hybrid Multi-mode Microplate Reader, Biotek, EUA), nos comprimentos de onda de 560/590 nm. Os dados obtidos para as células cultivadas sobre os discos polidos foram considerados como 100% de viabilidade (Figura 8).

Figura 8. Representação do ensaio de PrestoBlue, para avaliação da viabilidade dos osteoblastos após cultivo sobre diferentes superfícies (a) aplicação da solução de PrestoBlue (10% em DMEM livre de SFB) (b) incubação por 1 h à 37 °C (c) clivagem do sal de rezasurina em resorufina (d) análise da intensidade de fluorescência.



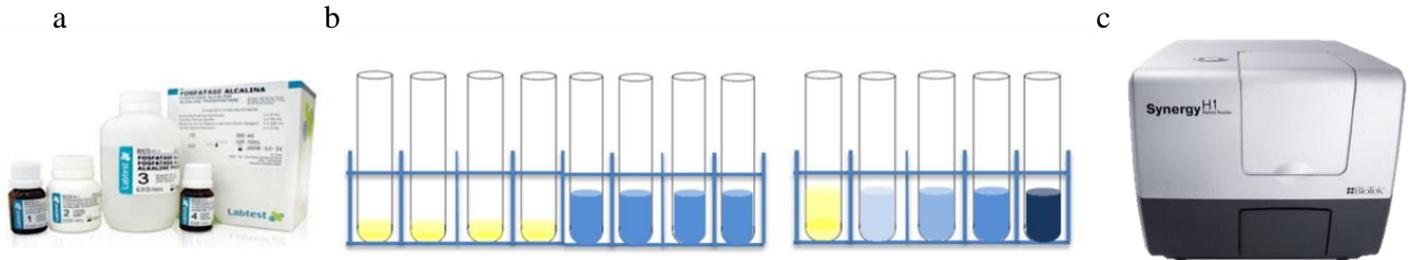
Fonte: autor

3.9 ATIVIDADE DE ALP

A enzima fosfatase alcalina (ALP) é expressa na membrana plasmática de diferentes células e participa da mineralização das fibrilas de colágeno a partir da incorporação de íons cálcio a essa matriz. Portanto, a atividade de ALP determina a capacidade de indução da mineralização da matriz extracelular. Neste estudo, a atividade de ALP foi determinada por

meio de um ensaio de ponto final, cujo substrato é a timolftaleína (Labtest, Lagoa Santa, MG, BR). Desta forma, a maior clivagem dessa proteína indica maior atividade de ALP (Figura 9).

Figura 9. Representação esquemática da análise da atividade de ALP (a) lise celular Lauril sulfato de sódio 1% (b) clivagem de Timolftaleína (c) análise de absorvância a 590 nm



Fonte: autor

3.10 EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

A tecnologia de PCR em tempo real (qPCR) foi utilizada para determinar a expressão do marcador de diferenciação, fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina (OCN), após sete dias do cultivo dos osteoblastos sobre as superfícies funcionalizadas.

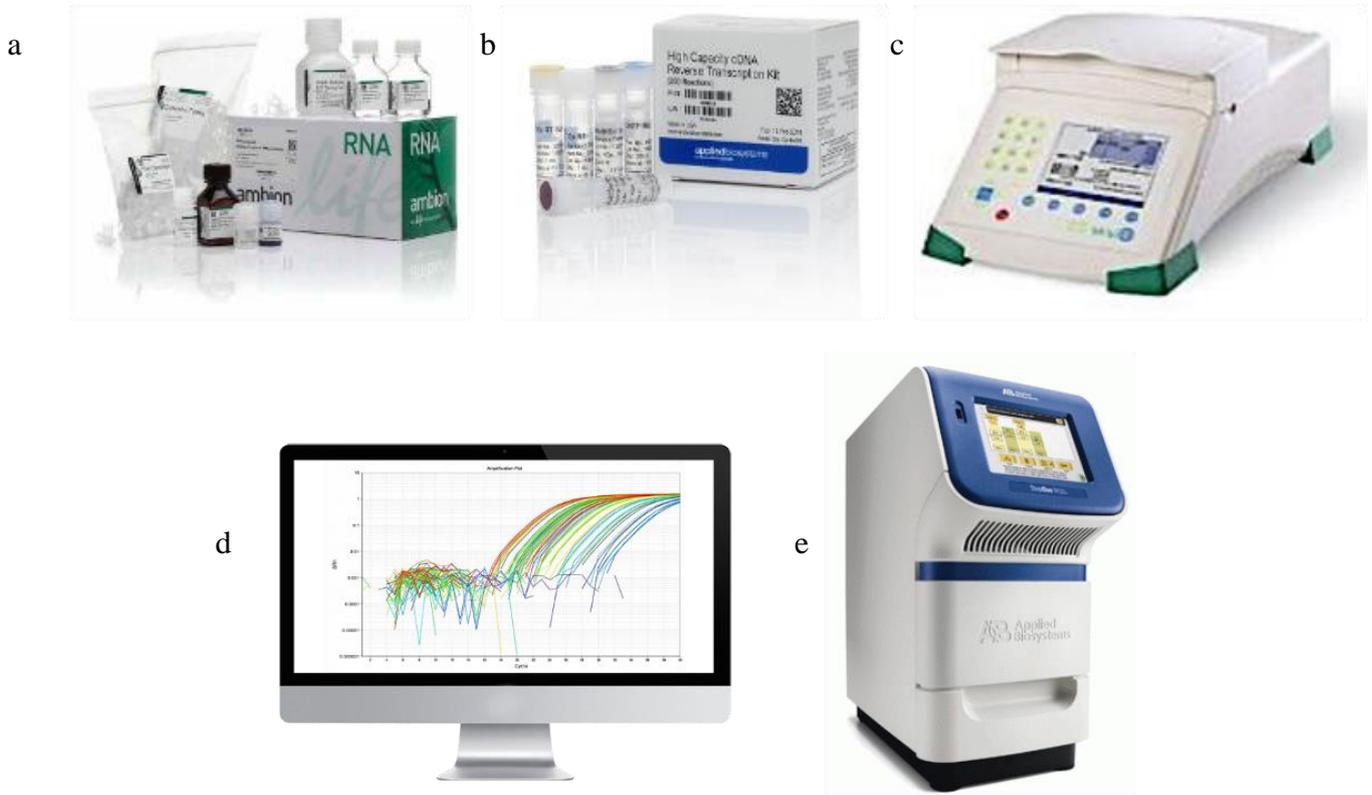
O isolamento do RNA total foi preparado por meio do Kit RNAqueous (Applied Biosystems), por meio de um sistema de filtração, conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, a concentração de RNA de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro (Take 3 System – Synergy H1). Para cada amostra de RNA obtida, foi sintetizado o DNA e amostras foram submetidas ao ciclo de amplificação recomendado pelo fabricante (Applied Biosystems): 25 °C (10 min), 37 °C (120 min), 85 °C (5 s), 4 °C (∞).

As reações foram produzidas com reagentes padronizados para PCR em tempo real Syber Green Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), acrescentando os conjuntos de primers específicos para cada gene (Tabela 1). As leituras de fluorescência foram efetuadas a cada ciclo de amplificação, utilizando-se para isso o equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) e, seguidamente, analisadas pelo Step One Software 2.1 (Applied Biosystems). Todas as reações foram normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes das variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado foi normalizado de acordo com a expressão do gene endógeno selecionado (RPL13) (Figura 10).

Tabela 1. Sequência de primers utilizados para cada gene alvo

Genes	Função / Nome do Gene	Sequências Forward/ Reverse
ALP	Fosfatase Alcalina	5'GACAAGAAGCCCTTCACTGC 3' 5' AGACTGCGCCTGGTAGTTGT3'
OCN	Osteocalcina	5'GGCGCTACCTGTATCAATGG 3' 5'TCAGCCAACCTCGTCACAGTC 3'
RPL13	Gene endógeno	5' CCGCTCTGGACCGTCTCAA 3' 5' CCTGGTACTTCCAGCCAACCT 3'

Figura 10. Representação das etapas realizadas durante o processamento das amostras para a análise da expressão gênica (a) extração do RNA total (b,c) obtenção do cDNA (d, e) PCR em tempo Real



Fonte: autor

3.11 ANÁLISE DOS RESULTADOS

O conjunto de dados foi avaliado quanto à sua distribuição sendo observada aderência à curva normal e homocedasticidade por meio do teste de Levene. Então, foram empregados testes paramétricos. Os dados de rugosidade média das superfícies foram analisados por meio do teste de t-Student. Os dados de viabilidade celular, atividade de ALP, e expressão gênica foram analisados por meio do teste de ANOVA a dois critérios, seguido do teste de Tukey. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância pré-determinado de 5%.

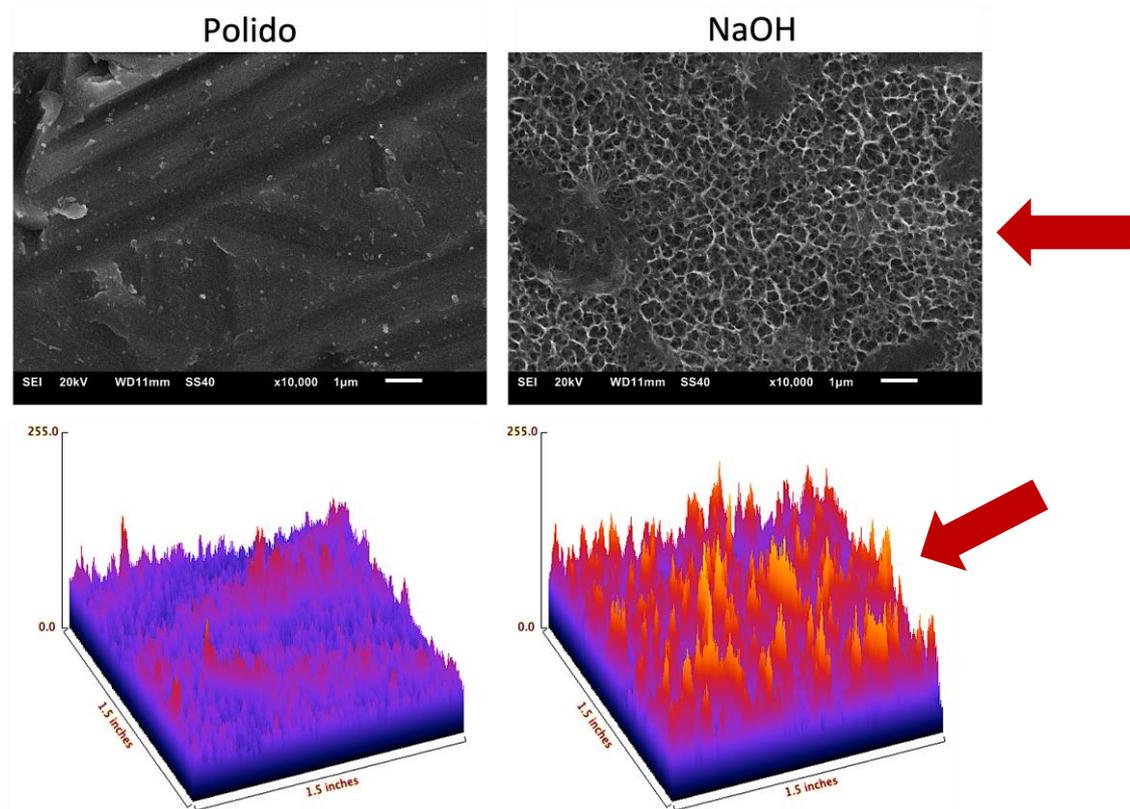
Os dados obtidos da análise da adesão celular por meio da microscopia de fluorescência foram avaliados qualitativamente.

4 RESULTADOS

4.1 TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE SUPERFICIAL

A avaliação qualitativa da topografia das superfícies polidas e alcalinizadas demonstrou maior alteração dos discos de titânio após a alcalinização, com a presença de grande densidade de microporosidades. A representação tridimensional desta topografia, obtida a partir do *Software ImageJ*, mostrou maior número e amplitude de picos e vales para a superfície alcalinizada em relação a superfície polida (Figura 11).

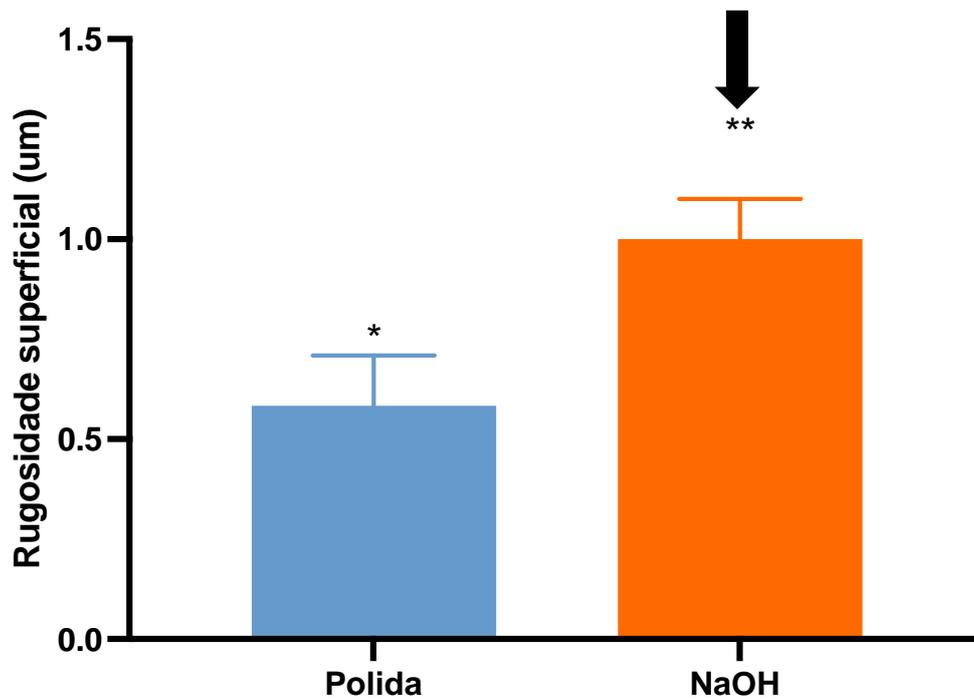
Figura 11. Fotomicrografias das amostras de discos de titânio polidos ou submetidos ao processo de modificação de superfície por alcalinização com NaOH, por meio de microscopia eletrônica de varredura e análise qualitativa da topografia superficial de cada amostra, analisada por meio do software Image J.



Fonte: autor

Quantitativamente, a rugosidade média da superfície de titânio alcalinizada ($0,9 \mu\text{m}$) foi significativamente maior quando comparada à superfície polida ($p < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12. Rugosidade superficial média dos discos polidos e submetidos à modificação de superfície por alcalinização. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (t-Student, $p < 0,05$), $n=6$.

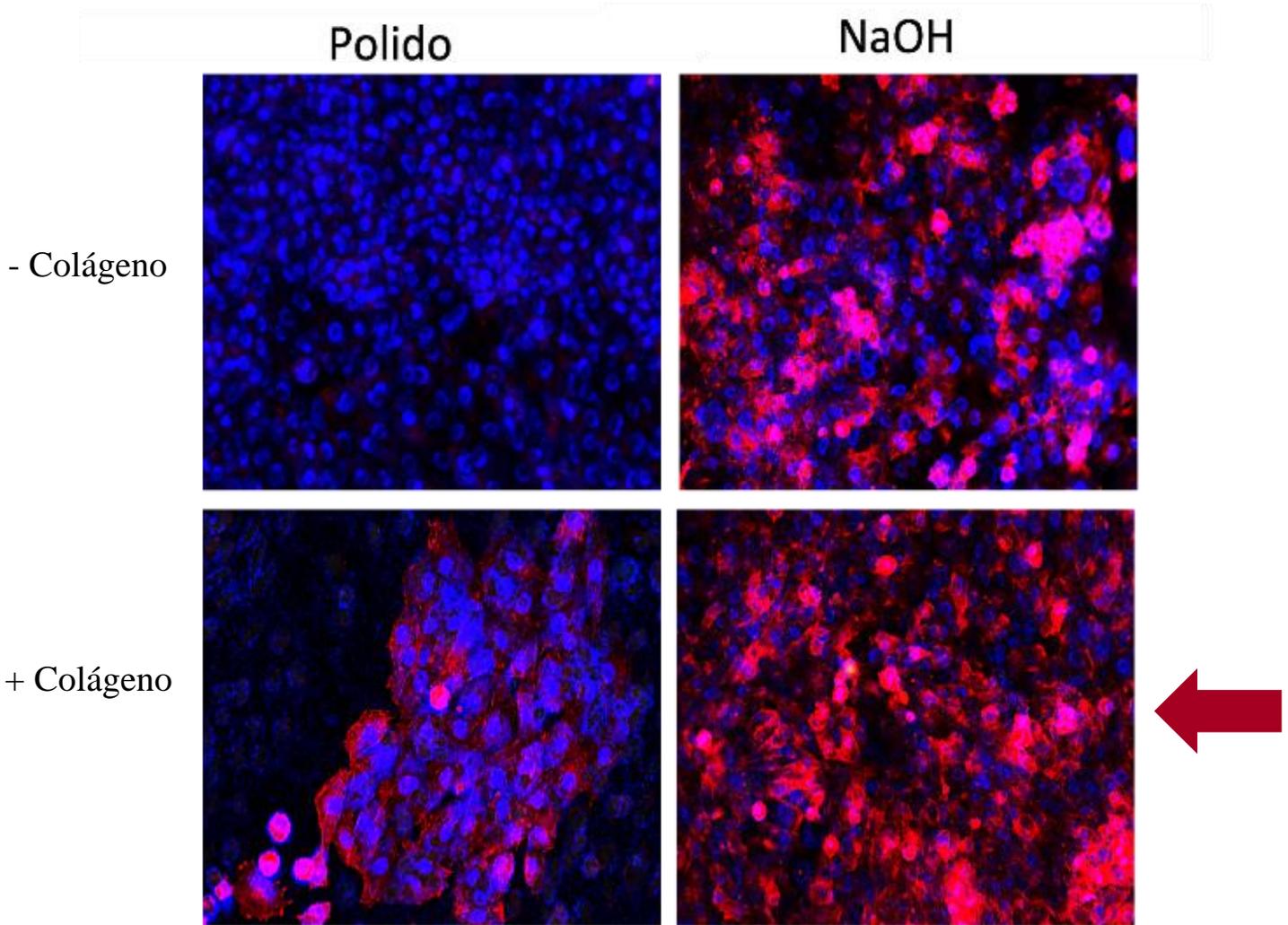


Fonte: Autor

4.2 ADESÃO CELULAR

A avaliação da adesão dos osteoblastos às diferentes superfícies, determinada por meio de microscopia de fluorescência demonstrou que essa adesão foi qualitativamente mais aderida para a superfície alcalinizada com NaOH e funcionalizada com colágeno tipo I, apresentando quantidade maiores de filamentos de actina e citoesqueleto com maior distribuição tridimensional, o que representa maior espriamento. Além disso, as superfícies submetidas aos tratamentos – alcalinização com NaOH ou funcionalização com colágeno tipo I – também apresentaram maior espriamento do citoplasma dos osteoblastos, demonstrado pela fluoresceína vermelha que demonstra a proteína actina do citoplasma celular. Essa marcação revela maior diâmetro celular para as superfícies modificadas, o que corresponde a uma melhor interação celular com o substrato (Figura 13).

Figura 13. Fotomicrografias das amostras de osteoblastos cultivados sobre discos de titânio polidos ou submetidos à alcalinização e/ou funcionalização com colágeno tipo I, por meio de microscopia de fluorescência. Nas amostras, o citoesqueleto celular pode ser identificado em vermelho (filamentos de actina), enquanto os núcleos estão identificados em azul (DNA) (x100).

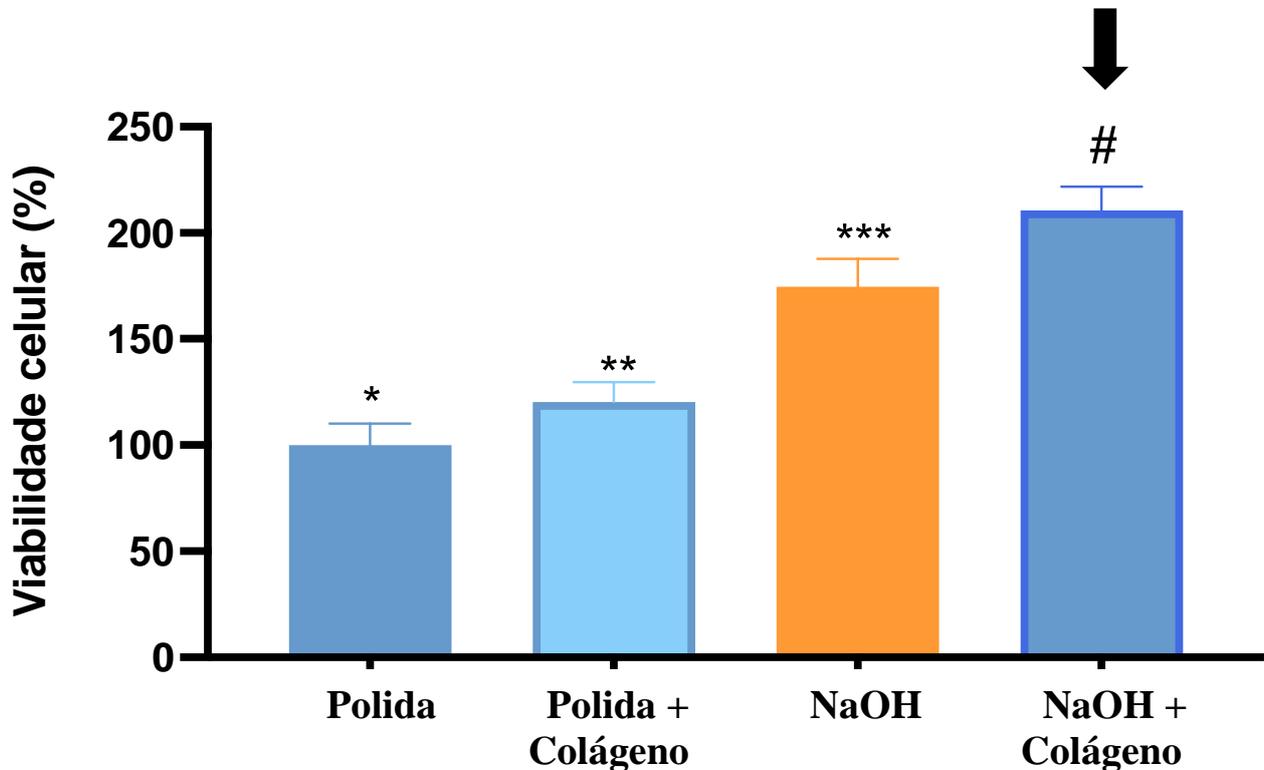


Fonte: autor

4.3 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade dos osteoblastos foi significativamente maior para as células cultivadas sobre as superfícies submetidas às modificações quando comparadas à superfície polida ($p < 0,05$). Os maiores valores (200%) foram observados para a associação da alcalinização com o NaOH e funcionalização com colágeno tipo I, seguido da alcalinização sem o colágeno, e da funcionalização sem a alcalinização e do polido (Figura 14).

Figura 14. Viabilidade dos osteoblastos cultivados sobre discos de titânio polidos, alcalinizados e/ou funcionalizados com colágeno tipo I. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).

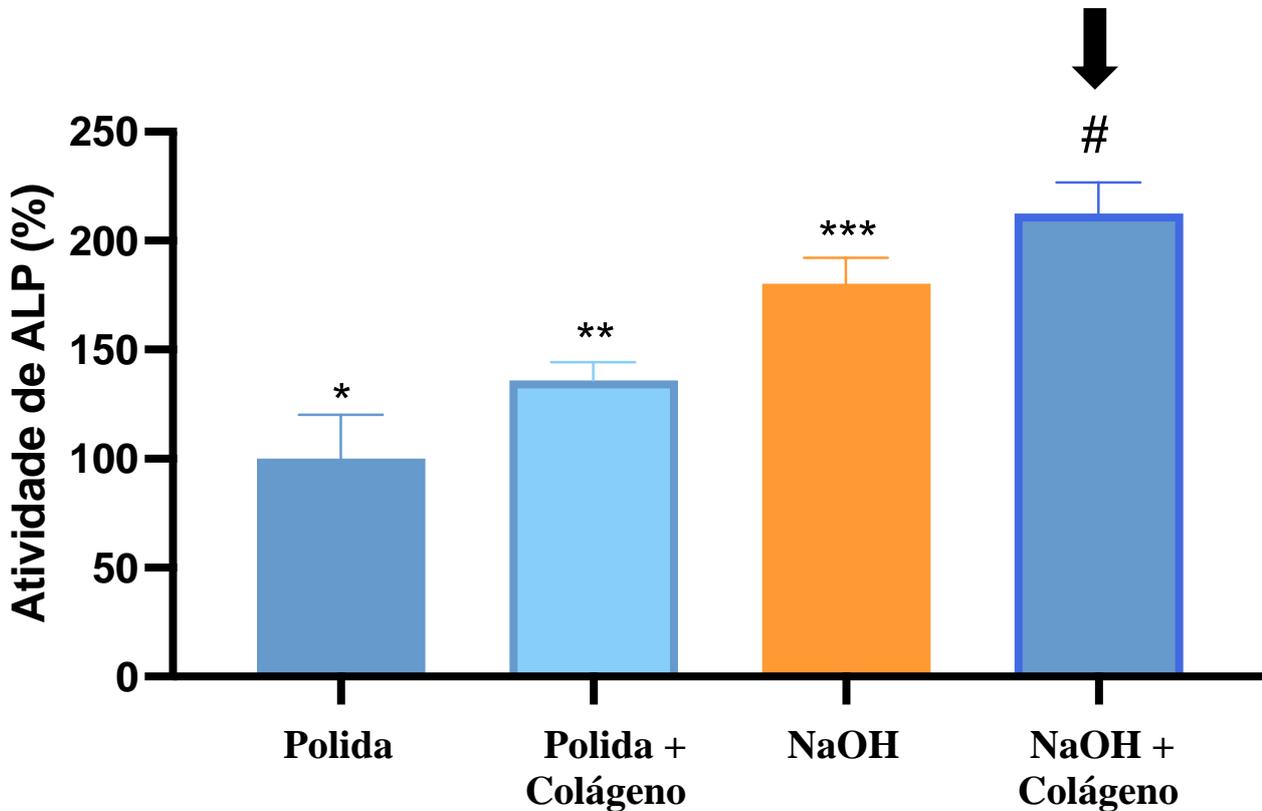


Fonte: autor

4.4 ATIVIDADE DE ALP

Os resultados obtidos para a análise da atividade de ALP seguiram padrões semelhantes aos observados para a viabilidade dos osteoblastos. Aumento significativo da atividade de ALP foi demonstrado tanto para as superfícies alcalinizadas quanto às funcionalizadas com colágeno tipo I, sendo que associação de ambas as modificações resultou nos maiores valores de atividade de ALP. As superfícies somente alcalinizadas ou funcionalizadas apresentaram valores intermediários quando comparadas aos demais grupos (Figura 15).

Figura 15. Atividade de ALP por osteoblastos cultivados sobre discos de titânio polidos, alcalinizados e/ou funcionalizados com colágeno tipo I. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).



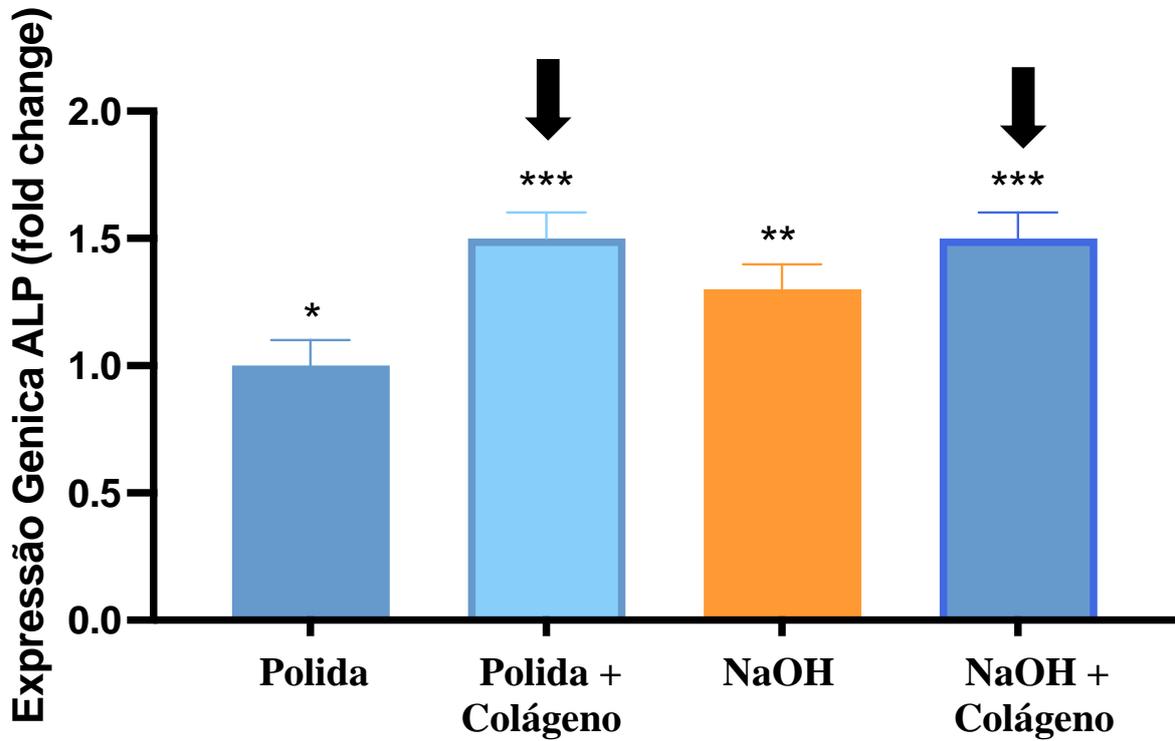
Fonte: autor

4.5 EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

A expressão de marcadores que indicam a diferenciação osteogênica demonstrou que a funcionalização com colágeno tipo I, associada ou não à alcalinização do titânio, resultou nos maiores valores para a expressão de ALP, quando comparada a superfície polida e somente alcalinizada (Figura 16). As células cultivadas sobre as superfícies somente alcalinizadas apresentaram valores intermediários com relação ao aumento da expressão de ALP.

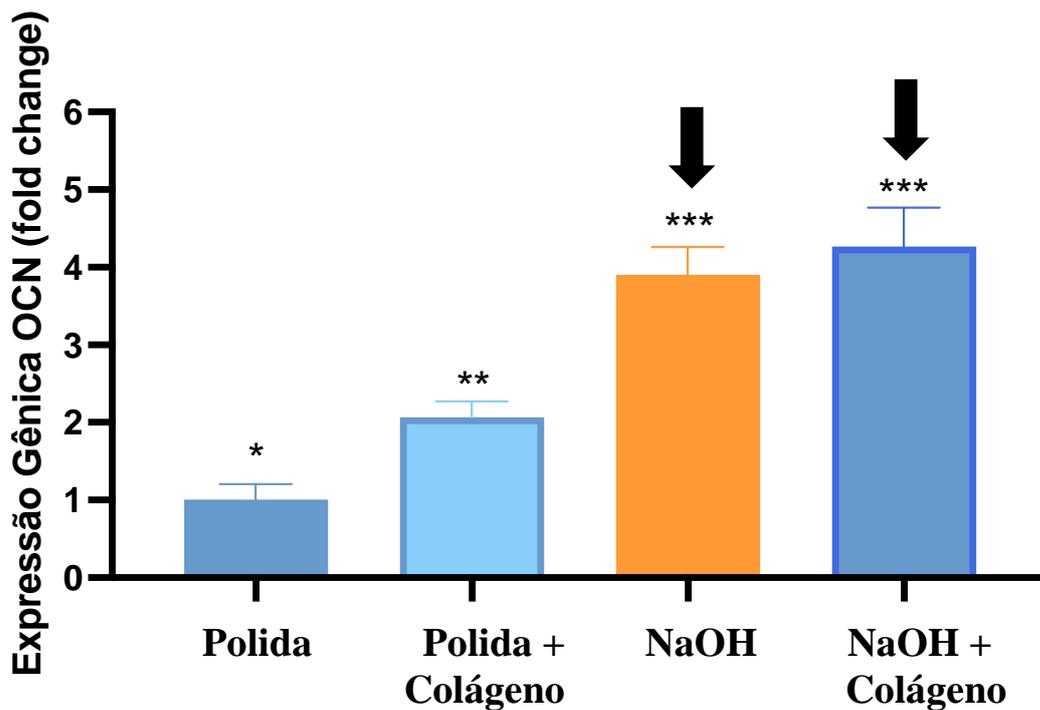
A expressão de OCN, por outro lado, demonstrou aumento para todas as modificações, com os maiores valores apresentados para a alcalinização associada ou não a funcionalização da superfície de titânio, seguida da somente alcalinizada e da polida (Figura 17).

Figura 16. Expressão gênica de ALP por osteoblastos cultivados sobre discos de titânio polidos, alcalinizados e/ou funcionalizados com colágeno tipo I. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: autor

Figura 17. Expressão gênica de OCN por osteoblastos cultivados sobre discos de titânio polidos, alcalinizados e/ou funcionalizados com colágeno tipo I. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: autor

5 DISCUSSÃO

As modificações e funcionalizações de superfícies de implantes têm demonstrado resultados promissores na aceleração do reparo peri-implantar. No presente estudo, ambas as propostas (alcalinização com o NaOH e funcionalização com o colágeno tipo I) demonstraram efeitos positivos sobre a resposta de osteoblastos, com aumento da adesão e viabilidade celular, bem como aumento da expressão e atividade de proteínas associadas à diferenciação osteogênica e mineralização da matriz extracelular (YAMAGUCHI et al., 2017).

Para este estudo, foram selecionados discos de titânio que serviram como substrato para os tratamentos e adesão celular, visando oferecer um modelo “*in vitro*” que mimetizasse o contato direto do implante com as células ósseas. Estudos anteriores demonstraram que implantes cuja superfície foi previamente modificada de forma a alterar sua topografia e rugosidade superficiais apresentam uma melhora na adesão celular e favorecem a regeneração óssea peri-implantar, gerando um potencial biológico maximizado (YAMAGUCHI et al., 2017). A modificação de superfície por meio de alcalinização resulta em alteração da topografia superficial (adesão celular) e aumento da rugosidade dos implantes de titânio (NISHIGUCHI et al., 2003; KOKUBO et al., 2004; TUGULU et al., 2010; KAWAI et al., 2012; CARMARGO et al., 2017), resultados que foram confirmados neste estudo, por meio do aumento de todos os parâmetros avaliados. Sendo eles, adesão celular, viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina e expressão gênica de marcadores de osteoblastos.

Quando o implante de titânio é instalado nos ossos gnáticos, este componente entra em contato com o oxigênio presente nos tecidos circundantes, resultando na formação espontânea de uma camada de óxido de titânio na superfície do implante. Essa camada é altamente estável e adere firmemente ao metal base, o óxido de titânio é biocompatível o que significa que não causa reações adversas no corpo humano. Além disso, é quimicamente inerte, o que impede que ela reaja com os tecidos ao redor. O óxido de titânio forma uma barreira física entre o implante e os tecidos, evitando o contato direto entre eles. Esta camada de óxido de titânio impede a migração de células inflamatórias e fibroblastos (células envolvidas na formação de tecido fibroso) para a superfície do implante; portanto, essa barreira física reduz a resposta inflamatória e minimiza a formação de tecido fibroso ao redor do implante. Além disso, a estabilidade química do óxido de titânio impede que ele se degrade ou reaja com as células vizinhas (BERBEL, 2021).

Neste estudo, a funcionalização do titânio foi realizada sem ou com a modificação

da superfície por meio de alcalinização com NaOH, o que resultou em melhora significativas de todos os parâmetros celulares avaliados. A adesão de células ósseas sobre a superfície do implante corresponde a eventos iniciais do reparo peri-implantar, logo após a resolução da fase inflamatória (MENDES; DAVIES, 2016). A quantidade e qualidade dessa adesão, representadas, respectivamente, pelo número de células aderidas e espraio celular sobre os substratos, está diretamente relacionada à deposição de matriz extracelular e, conseqüentemente, à neoformação tecidual (CAI; BOSSERT; JANDT, 2006; ENGEL et al., 2008). Portanto, os resultados apresentados neste estudo indicam que a combinação da modificação por alcalinização, associada à funcionalização com colágeno tipo I, favorece a adesão e o espraio celulares de forma mais efetiva quando comparada aos grupos submetidos apenas à alcalinização ou funcionalização.

A alteração de topografia promovida pela alcalinização é um fator importante para o aumento da adesão celular à superfície de titânio (CAI; BOSSERT; JANDT, 2006). Estudos anteriores demonstraram que, além de aumentar a superfície de contato, esta modificação também fornece uma estrutura tridimensional, facilitando o espraio celular. Além disso, também confere à superfície maior molhabilidade e maior interação com moléculas orgânicas. Esta interação também pode justificar a melhora da adesão a partir da combinação da alcalinização com a funcionalização da superfície de titânio (SUN et al., 2023)

A maior adesão celular observada para os discos submetidos somente à funcionalização com colágeno tipo I pode ser justificada também pela obtenção de uma matriz tridimensional, que favorece o espraio celular e também pelo reconhecimento de moléculas de superfície dos osteoblastos às fibrilas de colágeno, promovendo um ambiente semelhante àquele observado em condições teciduais. Este resultado também pôde ser observado para os discos submetidos à combinação de ambas as alterações dos discos de titânio. A presença do colágeno sobre os discos de titânio também atua como um fator de transcrição, de modo a induzir a expressão de fatores de crescimento, o que também resulta em maior atividade mitogênica (ROEHLECKEA et al., 2001).

Resultados semelhantes foram apresentados para estas terapias de funcionalização e alcalinização, na qual a superfície de titânio foi alcalinizada com NaOH, a fim de formar uma camada nanoestruturada sobre a superfície de titânio, obtendo então a rugosidade superficial (SILVA et al., 2023). Essa rugosidade está diretamente ligada à qualidade e velocidade da osseointegração. Esse tratamento de superfície organiza as células hospedeiras, proporcionando um ambiente favorável ao crescimento celular e fortalecer o processo de

osseointegração (MANIVASAGEM; POPAT, 2021). Além disso, a presença dos íons de Na^+ na superfície auxilia a formação de apatita e melhorar a bioatividade (KOKUBO et al., 2009). A morfologia, propriedades mecânicas e químicas, molhabilidade, apresentam influência na interação entre as células mesenquimais da medula óssea e a superfície do implante. Desse modo, as superfícies tratadas com o hidróxido de sódio melhora essa interação celular com a superfície, proporcionando a linhagem osteoblástica (MANIVASAGEM; POPAT, 2021). O contato entre a superfície do titânio, o coágulo sanguíneo e as células aumentam com a molhabilidade, resultando em melhor capacidade de adesão celular e aderência da rede de fibrina, conseqüentemente, favorecendo a osseointegração (SCARANO et al., 2022).

Por meio da análise da viabilidade celular é possível determinar a quantidade de células que foi capaz de aderir e permanecer viável sobre as diferentes superfícies, apenas alcalinizadas ou funcionalizadas ou ainda obtidas a partir da combinação de ambas. Portanto, o aumento da densidade de células viáveis sobre a superfície indica biocompatibilidade e aumento do metabolismo celular e pode indicar, mesmo que indiretamente, uma superfície que pode induzir a proliferação celular (CAI; BOSSERT; JANDT, 2006). A viabilidade dos osteoblastos também foi estimulada para todas as alterações de superfície testadas. A alteração de topografia, como anteriormente apresentado, facilita a adesão dos osteoblastos à superfície de titânio, podendo, assim, indicar um maior número de células viáveis na superfície dos discos. Além disso, o aumento da rugosidade superficial também pode favorecer a proliferação celular (CAI; BOSSERT; JANDT, 2006)

Além da adesão e viabilidade, a diferenciação das células ósseas também é essencial para a formação de matriz extracelular peri-implantar e posterior mineralização desta matriz, de forma a viabilizar o processo de osseointegração (MIAO et al., 2017). Neste estudo, esta diferenciação foi avaliada por meio da análise da expressão gênica de marcadores de diferenciação osteogênica e da atividade de ALP, que participa diretamente no processo de mineralização da matriz colágena.

Após sete dias de cultivo dos osteoblastos sobre as superfícies de titânio, a atividade de ALP também apresentou padrões semelhantes dos demais parâmetros avaliados, com aumento desta atividade para as superfícies alcalinizadas, o que também pode ser resultado da aceleração da diferenciação dos osteoblastos a partir de superfícies de maior rugosidade, à semelhança da matriz óssea mineralizada (MIAO et al., 2017). Para a superfície funcionalizada, a presença da matriz colágena é um fator gatilho para a expressão desta enzima e conseqüente mineralização da matriz extracelular por osteoblastos, o que justifica um

aumento dessa atividade para a funcionalização associada ou não à alcalinização. A expressão gênica da ALP em sete dias foi significativamente maior para os grupos funcionalizados, mantendo essa expressão por períodos prolongados, o que pode estar relacionada a uma manutenção da sua atividade também por períodos mais longos.

A expressão de OCN, por sua vez, foi maior para todos os grupos testados com a alcalinização e funcionalização, quando comparado com o grupo polido. No entanto, este aumento foi mais evidente para os grupos submetidos à modificação de superfície por alcalinização. O aumento da rugosidade superficial é um dos principais fatores responsáveis por induzir a expressão de marcadores osteogênicos (XING et al., 2014). A OCN é uma proteína responsável por promover um alinhamento dos cristais de hidroxiapatita na matriz colágena, e, portanto, apresenta uma expressão mais tardia no processo de mineralização quando comparada à ALP. Assim, a manutenção da expressão de ALP para as superfícies funcionalizadas pode ter sido responsável por atrasar ou modular a expressão de OCN para esses grupos. De modo geral, ambos os tratamentos de superfície propostos resultaram em melhora da resposta de osteoblastos cultivados sobre tais superfícies, o que pode acelerar o reparo peri-implantar. As superfícies submetidas à combinação da alcalinização e da funcionalização forneceram os melhores substratos para essas células.

As modificações de superfície visam acelerar o reparo periimplantar, principalmente em condições de desafios clínicos, como em pacientes sistemicamente comprometidos ou em uso de medicamentos que possam prejudicar este reparo. A partir dos resultados obtidos neste estudo, fica evidente a efetividade das modificações propostas para acelerar o reparo ósseo. Assim, a alcalinização com o NaOH e a funcionalização com o colágeno tipo I, pode beneficiar pacientes com doenças autoimunes (LES), osteoporose, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, pois os resultados foram promissores para essas doenças, como melhor adesão dos osteoblastos e diferenciação destas células.

Estudos posteriores são necessários, principalmente em *modelo in vivo*, para determinar e otimizar as condições clinicamente viáveis de tais estratégias.

6 CONCLUSÃO

A modificação de superfície de titânio por meio de alcalinização com o NaOH e funcionalização com colágeno tipo I favoreceram o metabolismo de osteoblastos.

A adesão celular foi positivamente modulada tanto para as superfícies submetidas à modificação de superfície de titânio por meio de alcalinização quanto por meio da funcionalização com colágeno tipo I, com a maior densidade e espraiamento celulares observados para a combinação das de ambas.

A viabilidade celular foi maior para as superfícies modificadas por alcalinização, seguido da funcionalização com colágeno tipo I e da combinação de ambas, respectivamente.

A atividade de ALP foi maior para as superfícies modificadas e funcionalizadas, respectivamente, sendo a combinação de ambas a superfície que apresentou os maiores valores desta atividade.

Para o período de 7 dias, a expressão gênica de ALP foi maior para os grupos funcionalizados, enquanto a de OCN, foi mais evidente para os grupos submetidos à alcalinização.

REFERÊNCIAS

- AZEEZ, T.A. Osteoporosis and cardiovascular disease: a review. **Molecular Biology Reports**, v. 50, p. 1753–1763, 2023.
- BASSO, F.G; PANSANI, T.N.; CARDOSO, L.M.; HEBLING, J.; REAL, R.P.V.; COSTA, C.A.S. Influence of bisphosphonates on the behavior of osteoblasts seeded onto titanium discs. **Brazilian Dental Journal**, v. 31, p. 304 – 309, jun, 2020.
- BERBEL, L. O. **Avaliação da resistência à corrosão da liga Ti-6Al-4V para implantes dentários em ambientes aerados e deaerados**. 2021. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.
- BRANEMARK, P. I. Osseointegration and its experimental background. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 50, n. 3, p. 399-409, sep, 1983.
- CAI, K.; BOSSERT, J.; JANDT K. D. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? **Colloids and Surfaces: B Biointerfaces**, v. 49, p. 136 – 144, may 2006.
- CAMARGO, W. A.; TAKEMOTO, S.; HOEKSTRA, J. W.; LEEUWENBURGH, S.; JANSEN, J. A.; VAN DEN BEUCKEN, J.; ALGHAMDI, H. S. Effect of surface alkali-based treatment of titanium implants on ability to promote in vitro mineralization and in vivo bone formation. **Acta Biomaterialia**, v. 57, p. 511–523, jul. 2017.
- CARDOSO, L.M.; PANSANI, T.N.; DE SOUZA COSTA, C.A.; BASSO, F.G. Naringenin and proanthocyanidins pre-treatment decreases synthesis and activity of gelatinases induced by zoledronic acid in a dental implant surface in vitro model. **Archives of Oral Biology**, v. 151, p. 105703, apr, 2023.
- COSTA, A. L. P.; SILVA-JÚNIOR, A. C. S.; PINHEIRO, A. L. Factors associated with the etiology and pathogenesis of autoimmune diseases. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 48, n. 2, p. 92–106, 2019.
- DE JONGE, L.T.; LEEUWENBURGH, S.C.; WOLKE, J.G.; JANSEN, J.A. Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. **Pharmaceutic Research**, v. 25, p. 2357-2369, 2008.
- ENGEL, E.; MICHIARDI, A.; NAVARRO, M.; LACROIX, D.; & PLANELL, J. A. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 1, p.39–47, jan. 2008.
- GEIBLER, U.; HEMPEL, U.; WOLF, C. SHARNWEBER, D. WORCH, H. WENZEL, W. Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, n.4, p. 753-760, set. 2000.
- GRONOWICZ, G.; MCCARTHY M. B. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 14, n. 6, p. 878-887, nov. 1996.

KATO, A.; MIYAJI, H.; ISHIZUKA, R.; TOKUNAGA, K.; INOUE, K.; KOSEN, Y.; YOKOYAMA, H.; SUGAYA, T.; TANAKA, S.; SAKAGAMI, R.; KAWANAMI, M. Combination of root surface modification with BMP-2 and collagen hydrogel scaffold implantation for periodontal healing in beagle dogs. **Open Dentistry Journal**, v. 30, p. 52-59, 2015.

KAWAI, T.; TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; TANAKA, M.; AKIYAMA, H.; NAKAMURA, T.; MATSUDA, S. Comparison between alkali heat treatment and sprayed hydroxyapatite coating on thermally-sprayed rough Ti surface in rabbit model: Effects on bone-bonding ability and osteoconductivity. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B**, v. 103B, n. 5, p. 1069-1081, 2015.

KHANG, D.; LU, J.; YAO, C.; HABERSTROH, K. M.; WEBSTER, T. J. The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium. **Biomaterials**, v. 29, n. 8, p. 970-983, mar. 2007.

KOKUBO, T.; MATSUSHITA, T.; TAKADAMA, H.; KIZUKI, T. Development of bioactive materials based on surface chemistry. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 7, p. 1267-1274, apr. 2009.

KOKUBO, T.; KIM, H.-M.; KAWASHITA, M.; NAKAMURA, T. REVIEW Bioactive metals: preparation and properties. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 2, p. 99–107, 2004.

KULLAR, A. S.; MILLER, C. S. Are There Contraindications for Placing Dental Implants? **Dental Clinics of North America**, v. 63, n. 3, p. 345-362, jul. 2019.

MANIVASAGAM, V. K.; POPAT, K.C. Hydrothermally treated titanium surfaces for enhanced osteogenic differentiation of adipose derived stem cells. **Materials Science and Engineering: C**, v. 128, p. 1-13, sept. 2021.

MENDES, V. C.; DAVIES, J. E. A New Perspective on the Biology of Osseointegration. **Journal of the São Paulo Association of Dental Surgeons**, v.70, n.2, p. 166-171, jun. 2016.

MIAO, X.; WANG, D.; XU, L.; WANG, J.; ZENG, D.; LIN, S.; HUANG, C.; LIU, X.; JIANG, X. The response of human osteoblasts, epithelial cells, fibroblasts, macrophages and oral bacteria to nanostructured titanium surfaces: a systematic study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1415- 1430, feb. 2017

MOURA NETO, J.; CARDOSO, L.M.; PANSANI, T.N.; RAUCCI, L.M.C.; DE SOUZA COSTA, C.A.; BASSO, F.G. Influence of titanium and zirconia substrates on the synthesis of inflammatory mediators. **Biointerphases**, v. 18, p. 041002, jul. 2023.

NISHIGUCHI, S.; FUJIBAYASHI, S.; KIM, H. M.; KOKUBO, T.; & NAKAMURA, T. Biology of alkali-and heat- treated titanium implants, **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 67, p. 26–35, sept. 2003.

OLTEAN-DAN, D.; DOGARU, G.B.; JIANU, E.M.; RIGA, S.; TOMOAIACOTISEL, M.; MOCANU, A.; BARBU-TUDORAN, L.; TOMOAIAG, G. Biomimetic composite coatings for

activation of titanium implant surfaces: methodological approach and in vivo enhanced osseointegration. **Micromachines**, v. 12, p. 1352, oct 2021.

PANSANI, T.N.; PHAN, T.H.; LEI, Q.; KONDYURIN, A.; KALLIONIS, B.; CHRZANOWSKI, W. Extracellular-vesicle-based coatings enhance bioactivity of titanium implants-surfEV. **Nanomaterials**, v. 29, p. 1445, may 2021.

ROEHLECKE, C.; WITT, M.; KASPER, M.; SCHULZE, E.; WOLF, C.; HOFER, A.; FUNK, R. W. Synergistic effect of titanium alloy and type I collagen on cell adhesion, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. **Cells Tissues Organs**, v. 168, n. 3, p. 178-187, feb. 2001.

SANTOS, L. R. **Desenvolvimento de superfície de titânio bioativa por meio de alcalinização: efeito na adesão de inibidor de metaloproteinases e no metabolismo de osteoblastos humano**. Orientadora: Fernanda Gonçalves Basso. 2021. 37f. (Trabalho de Conclusão de Curso) (Graduação em Odontologia) - Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2021.

SCARANO, A.; REXHEP, S.T.; LEO, L.; LORUSSO, F. Wettability of implant surfaces: Blood vs autologous platelet fluid (APL). **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 126, feb. 2022.

SILVA, F. L.; RODRIGUES, F.; PAMATO, S.; PEREIRA, J. R. Implant surface treatment: a literature review **Revista Faculdade Odontologia – Universidade Passo Fundo**, v. 21, n. 1, p. 136-142, apr. 2016

SILVA, I. R. D.; BARRETO, A. T. D. S.; SEIXAS, R. S.; PAES, P. N. G.; LUNZ, J. D.N.; THIRÉ, R. M. D. S.M.; JARDIM, P. M. Novel Strategy for Surface Modification of Titanium Implants towards the Improvement of Osseointegration Property and Antibiotic Local Delivery. **Materiais (Basileia)**, v. 16, n. 7, mar. 2023.

SUN, X. D.; LIU, T. T.; WANG, Q. Q.; ZHANG, J.; CAO, M. S. Surface modification and functionalities for titanium dental implants. **ACS Biomaterials Science Engineering**, v. 14, n. 8, p. 4442-4461, jul. 2023.

TRENTO, G.; DE A. CARVALHO, P. H.; DE C. REIS, E. N. R.; SPIN-NETO, R.; BASSI, A. P. F.; PEREIRA-FILHO, V. A. Bone formation around two titanium implant surfaces placed in bone defects with and without a bone substitute material: A histological, histomorphometric, and micro-computed tomography evaluation. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 22, n. 2 p. 177 - 185, 2020

TUGULU, S.; LÖWE, K.; SCHARNWEBER, D.; SCHLOTTIG, F. Preparation of superhydrophilic microrough titanium implant surfaces by alkali treatment. **Journal of Materials Science – Materials in Medicine**, v. 21, p. 2751–2763, aug. 2010.

VILA REAL, R. P.; PANSANI, T. N.; CARDOSO, L. M.; DE SOUZA COSTA, C. A.; BASSO, F.G. Titanium alkalization improves response of osteoblasts to zoledronic acid. **Biointerphases**, v. 17, n.3, may 2022.

WANG, L., GAO, Z., LIU, C. LI, J. Potential biomarkers of abnormal osseointegration of implants in type II diabetes mellitus. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 583, 2021

WENNERBERG A, ALBREKTSSON T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review, **Clinical Oral Implant Research**, v.20, p.172– 184, sept. 2009.

XING, H.; KOMASSA, S.; TAGUCHI, Y.; SEKINO, T.; OKAZAKI, J. Osteogenic activity of titanium surfaces with nanonetwork structures. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 4, p. 1741-1755, apr. 2014.

YAMAGUCHI, S.; NATH, S.; SUGAWARA, Y.; DIVAKARLA, K.; DAS, T.; MANOS, J.; CHRZANOWSKI, W.; MATSUSHITA, T.; KOKUBO, T. Two-in-one biointerfaces-antimicrobial and bioactive nanoporous gallium titanate layers for titanium implants. **Nanomaterials**, v. 7, n. 229, p. 1-17, 2017.

YU, X.; WALSH, J.; WEI, M. Covalent Immobilization of Collagen on Titanium through Polydopamine Coating to Improve Cellular Performances of MC3T3-E1 Cells. **Royal Society Chemistry Advances**, v. 14, n. 4, p. 7185-7192, nov. 2013

ZENG, Y.; YANG, Y.; CHEN, L.; YIN, D.; ZHANG, H.; TASHIRO, Y.; INUI, S.; KUSUMOTO, T.; NISHIZAKI, H.; SEKINO, T.; OKAZAKI, J.; KOMASA, S. Optimized Surface Characteristics and Enhanced in Vivo Osseointegration of Alkali-Treated Titanium with Nanonetwork Structures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1127-1142, mar. 2019.