

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ ESCOLA DE MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

COMPORTAMENTO *IN VITRO* DE CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS E FIBROBLASTOS CULTIVADOS SOBRE NANOTUBOS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO SUBMETIDOS A TRATAMENTO TÉRMICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde Orientadora: Dra. Selene Elifio Esposito Co-Orientador: Dr. Paulo César Soares Júnior

CURITIBA 2019

MARCELA FERREIRA DIAS NETIPANYJ

COMPORTAMENTO IN VITRO DE CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS E FIBROBLASTOS CULTIVADOS SOBRE NANOTUBOS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO SUBMETIDOS A TRATAMENTO TÉRMICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde Orientadora: Dra. Selene Elifio Esposito Co-Orientador: Dr. Paulo César Soares Júnior

CURITIBA 2019



Pontifícia Universidade Católica do Paraná Escola de Medicina Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PUBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFICIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 29 dias do mês de março de 2019 às 14hs e 00min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese "Comportamento in vitro de células osteoprogenitoras e fibroblastos cultivados sobre nanotubos de óxido de titânio submetidos a tratamento térmico" apresentado por Marcela Ferreira Dias Netipanyj para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito – Presidente	sen:
(PUCPR)	00.7
Prof. Dr. Ricardo Aurino Pinho – (PUCPR)	Consultante)
Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached - (PUCPR)	1 ed a
Profa. Dra. Ana Paula Rosifini Alves Claro – (UNESP)	dia Paula Alus Clare
Profa. Dra. Silvia Regina Tozado Prado – (UFPR)	ngto

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Selene Elifio Esposito Prof. Dr. Ricardo Aurino Pinho Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached Profa. Dra. Ana Paula Rosifini Alves Claro Profa. Dra. Silvia Regina Tozado Prado

Conceito_Aprivada_
Conceito_Apourado
Conceito APROVADA
Conceito aprovada
Conceito avarovado
Parecer Final: Aportado

Observações da Banca Examinadora:

Profa. Sra. Selene Elifio Esposito Presidente da Banca Examinadora Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena Coordenadora do PPGCS-PUCBR

Rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho – CEP 80215-901 condenadora do Pisa Graduação Tel./Fax: (41) 3271-2285 – E-mail: proceedina do reservo da condenadora do Substance do Substance do Substance Escola da Medicina - PUCPR www.pucpr.br - Curitiba - Paraná - Brasil

Dados da Catalogação na Publicação Pontifícia Universidade Católica do Paraná Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR Biblioteca Central Edilene de Oliveira dos Santos CRB 9 / 1636

Г

N961c 2019	Netipanyj, Marcela Ferreira Dias Comportamento In Vitro de células osteoprogenitoras e fibroblastos cultivados sobre nanotubos de dióxido de titânio submetidos a tratamento térmico / Marcela Ferreira Dias Netipanyj ; orientadora, Selene Elifio Esposito ; coorientador, Paulo César Soares Junior2019 94 f. : il. ; 30 cm
	Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2019 Bibliografia: f. 75-84
	 Nanotecnologia. 2. Tratamento térmico. 3. Titânio. 4. Osseointegração. Protese. I. Elífio-Esposito, Selene Lobo. II. Soares Junior, Paulo César. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título. CDD 20. ed. – 620.5

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu esposo Rodrigo, que me apoiou incondicionalmente nesta trajetória, e ao meu pequeno Miguel com o mais puro e sincero amor.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Selene Elifio Esposito, obrigada pelo aceite em minha orientação, pela confiança em mais esta etapa de minha formação profissional, por agregar valores científicos que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, e acima de tudo obrigada pela compreensão e amizade.

Ao Professor Doutor Paulo César Soares Júnior, obrigada pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho, tanto as etapas desenvolvidas no Brasil, como as etapas na Colorado State University, meu sincero agradecimento pela confiança e pelo compartilhamento de seu conhecimento em Biomateriais, que foram grandemente enriquecedores para minha formação.

Ao Professor Doutor Ketul C. Popat, obrigada pela simplicidade na forma de ensinar, por sua supervisão durante o período na Colorado State University, por compartilhar seu vasto conhecimento em Biomateriais, e pela confiança depositada em meu trabalho.

À equipe do Laboratório Experimental Multiusuário, que tornaram o desenvolvimento deste trabalho muito mais prazeroso e divertido.

À todo o grupo de pesquisa, pela troca de conhecimento, auxílio no cultivo celular, amizade, e principalmente por tornarem esta etapa muito mais leve.

À Capes e ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

À PUCPR pela infraestrutura.

À Colorado State University pela infraestrutura.

À minha família por respeitar incondicionalmente minhas escolhas, por me apoiar e incentivar, e por serem meu porto seguro.

À Deus, que permitiu esta caminhada e que nos momentos difíceis acalmou minha mente e coração.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
SUMÁRIO	II
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	VI
LISTA DE FIGURAS	.VIII
LISTA DE TABELAS	XII
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. BIOMATERIAIS	13
1.1.1. CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS	14
1.2. TITÂNIO	15
1.2.1. MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO	17
1.2.2. NANOTUBOS DE TIO ₂	19
1.2.3. MODIFICAÇÃO DA FASE CRISTALINA DE NANOTUBOS DE TIO2	21
1.3. CARACTERÍSTICAS DA SUPERFÍCIE DOS NANOTUBOS DE TIO COMPORTAMENTO CELULAR	₂ E 22
1.4. RESPOSTA CELULAR E OSSEOINTEGRAÇÃO	25
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVO GERAL	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MÉTODOS	33
4.1. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES NANOESTRUTURAL	DAS 33
4.1.1. ANÁLISE DA MORFOLOGIA	34
4.1.2. ANÁLISE DE ÂNGULO DE CONTATO	34
4.1.3. ANÁLISE DE ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS	35
4.2. CULTIVO CELULAR E PREPARAÇÃO PARA OS ENSAIOS	35
4.2.1. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	35
4.2.2. ANÁLISE DE TOXICIDADE CELULAR	36

4.2.3. ANÁLISE DA MORFOLOGIA E DENSIDADE CELULAR
4.2.4. ANÁLISE DA INTERAÇÃO CÉLULA/BIOMATERIAL
4.3. ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR E DEPOSIÇÃO DE MATRIZ ÓSSEA
4.3.1. ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA
4.3.2. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À DIFERENCIAÇÃO CELULAR
4.3.3. DEPOSIÇÃO DE CÁLCIO
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA
5. RESULTADOS
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE TIO₂ PRODUZIDOS POR ANODIZAÇÃO ELETROQUÍMICA E RECOZIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS
5.2. TESTES BIOLÓGICOS COM FIBROBLASTOS
5.3. TESTES BIOLÓGICOS COM ADSCs
6. DISCUSSÃO
6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE TIO2
6.2. ESTUDO BIOLÓGICO COM FIBROBLASTOS
6.3. ESTUDO BIOLÓGICO COM ADSCs
7. CONCLUSÃO
8. REFERÊNCIAS
APÊNDICE A – FINANCIAMENTOS E COLABORAÇÕES DESTA PESQUISA 85
APÊNDICE B – ARTIGO CO-AUTORIA (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)
APÊNDICE C – ARTIGO CO-AUTORIA
APÊNDICE D – ARTIGO CO-AUTORIA
APÊNDICE E – ARTIGO CO-AUTORIA
APÊNDICE F – ARTIGO CO-AUTORIA
APÊNDICE G – ARTIGO CO-AUTORIA91
APÊNCICE H - ARTIGOS SUBMETIDOS/EM REVISÃO92
APÊNDICE I- PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS INTERNACIONAIS COM APRESENTAÇÃO ORAL
APÊNDICE J - ORIENTAÇÕES REALIZADAS

RESUMO

O titânio (Ti) e suas ligas têm sido estudados extensivamente para aplicações em implantes ortopédicos e odontológicos devido às suas boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade. No entanto, falhas relacionadas a corrosão do implante tem aumentado o número de cirurgias de revisão, o que demanda o desenvolvimento de materiais mais resistentes que promovam ainda uma rápida osseointegração. Nanotubos de TiO₂ fornecem uma interface aprimorada para interações entre superfícies de implantes e células no tecido. Além disso, modificação na fase cristalina (anatase/rutilo) da camada de TiO₂ melhora a resistência a corrosão do material. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de células tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC) e fibroblastos cultivados sobre nanotubos de TiO₂ com modificação na fase cristalina. Os nanotubos de TiO₂ foram fabricados por anodização eletroquímica em eletrólito contendo dietilenoglicol e ácido fluorídrico, por 6 horas a 60 V, seguido de tratamento térmico à 300, 530 e 630°C por 5 horas. Posteriormente foram caracterizados guanto a morfologia, molhabilidade, cristalinidade e adsorção de proteínas, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise de ângulo de contato, difração de raios x (DRX) e MEV seguida de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio X (XPS). A bioatividade das superfícies foi avaliada por período curto (1, 4 e 7 dias) quanto a toxicidade, viabilidade, adesão/proliferação e morfologia, por meio dos testes de Lactato Desidrogenase, CellTitter-Blue[®], microscopia de fluorescência e MEV, respectivamente. A capacidade osteogênica das ADSC foi avaliada por período longo (7, 14 e 21 dias) quanto à atividade de Fosfatase Alcalina (ALP) e produção de Osteopontina (OPN) e Osteocalcina (OCN), além da análise da deposição de cálcio e análise morfológica. Os resultados indicam que foi possível fabricar nanotubos com diâmetro de ± 300 nm, com diferentes fases cristalinas: anatase (300°C) e anatase/rutilo (530 e 630°C). As análises biológicas evidenciaram que a modificação das superfícies não foi tóxica e favoreceu a viabilidade de fibroblastos e ADSCs. A comparação entre o dia 1 e o dia 7 mostrou um aumento significativo (p<0.001) do número de Fibroblastos e ADSCs em todas as superfícies. Após a diferenciação osteogênica, a comparação entre a semana 1 e a semana 3 indicou que superfícies contendo nanotubos favoreceram significativamente a produção de ALP e OPN quando comparadas ao Ti cp (p<0.001). A produção de OCN aumentou significativamente (p<0.001) nas superfícies tratadas a 530 e 630°C, quando comparadas ao Ti cp. Adicionalmente, houve aumento significativo na deposição de cálcio na superfície tratada a 630°C, comparada ao Ti cp na semana 3 do estudo. Foi possível concluir que a modificação na fase cristalina dos nanotubos de TiO₂, principalmente os que continham a fase anatase/rutilo, favoreceram a diferenciação celular e mineralização do tecido. Estes dados nos impulsionam a seguir com o estudo da modificação da fase cristalina de nanotubos de TiO2 em modelos in vivo.

ABSTRACT

Titanium (Ti) and its alloys have been extensively studied for applications in orthopedic and dental implants because of their good mechanical properties and biocompatibility. However, failures related to implant corrosion have increased the number of revision surgeries. TiO₂ nanotubes provide an improved interface for interactions between implant surfaces and tissue cells. In addition, modification in the crystalline phase (anatase / rutile) of the TiO2 layer improves the corrosion resistance of the material. The aim of this work was to evaluate the response of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs) and Fibroblasts cultured on TiO₂ nanotubes with modification in the crystalline phase. The TiO₂ nanotubes were manufactured by electrochemical anodization containing diethyleneglycol and hydrofluoric acid for 6 hours at 60 V, followed by heat treatment at 300, 530 and 630 ° C for 5 hours. Afterwards, were characterized by morphology, wettability, crystallinity and protein adsorption using scanning electron microscopy (SEM), contact angle, X-ray diffraction (XRD), SEM following of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) respectively. Surface bioactivity was evaluated for toxicity, viability, adhesion / proliferation and morphology for the short period (1, 4 and 7 days) by Lactate Dehydrogenase, CellTitter-Blue®, fluorescence microscopy and SEM tests, respectively. The osteogenic capacity of the ADSC was evaluated over a long period (7, 14 and 21 days) for the production of: Alkaline Phosphatase (ALP), Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OCN), besides calcium deposition analysis and morphological analysis, through biochemical analysis, immunofluorescence, colorimetric and SEM, respectively. The results indicate that it was possible to manufacture nanotubes with a diameter of ± 300 nm, with different crystalline phases: anatase (300°C) and anatase / rutile (530 and 630 ° C). In addition, the presence of nanotubes favored a slightly higher adsorption of fibrinogen when compared to commercially pure Ti (Ti cp). Biological analyzes showed that the modification of the surfaces was non-toxic and favored the viability of fibroblasts and ADSCs. The relation between day 1 and day 7 showed a significant increase (p <0.001) of fibroblasts and ADSCs on all surfaces. After osteogenic differentiation, the relation between week 1 and week 3 indicated that nanotubes surfaces favored significantly (p < 0.001) the production of ALP and OPN when compared to Ti cp. The OCN production increased significantly (p < 0.001) on surfaces treated at 530 and 630°C, when compared to Ti cp. Additionally, there was a significant increase in calcium deposition on surfaces treated at 630°C, compared to Ti cp at week 3. It was possible to conclude that the modification in the crystalline phase of TiO2 nanotubes, especially those containing the anatase / rutile phase, favored cell differentiation and tissue mineralization. These data stimulate us to follow the study of the modification of the crystalline phase of TiO₂ nanotubes in *in vivo* models.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ADSC Adipose Derived Stem Cell Célula tronco derivada de tecido adiposo
- ALB Albumina
- ALP Alkaline Phosphatase Fosfatase Alcalina
- **BCA** Bicinchoninic acid Ácido bicinconínico
- Ca Cálcio
- CO₂ Dióxido de carbono
- DAPI 4,6-Diamino-2-phenylindole 4,6-Diamino-2-Fenilindol
- EDTA Ethylenediamine tetraacetic acid Ácido etilenodiaminotetracético
- FIB Fibrinogênio
- FITC Fluoresceína-5-isotiocianato
- HAP Hydroxyapatite Hidroxiapatita
- HMDS Hexametildisilazone
- hMSC human Mesenquimal Stem Cell Célula tronco mesenquimal humana
- HSC Hematopoietic Stem Cell Célula tronco hematopoiética
- LDH Lactate Dehydrogenase Lactato desidrogenase
- MEV Microscopia eletrônica de varredura
- MSC Mesenquimal Stem Cell Célula tronco mesenquimal
- Na Sódio
- **OCN** Osteocalcina
- **OPN** Osteopontina
- PBS Phosphate Buffered Saline Tampão fosfato salino

SFB – Soro fetal bovino

SPSS – Statistic Package for the Social Science – Pacote Estatístico para Ciências Sociais

TA – Temperatura Ambiente

Ti – Titânio

- Ti cp Titânio comercialmente puro
- TiO₂ Dióxido de Titânio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens obtidas por MEV de nanotubos de TiO₂ de diferentes diâmetros: a) 15 nm, b) 50 nm, c) 100 nm, e de nanoporos de TiO₂: d) 15 nm. Imagens transversais e vista superior das nanoestruturas ao longo da seção transversal de e) nanotubos de TiO₂ e f) nanoporos de TiO₂.

Figura 7: Organização hierárquica do tecido ósseo em diferentes escalas. (a) camada compacta externa, (b) ósteons, (c) célula residente expondo receptores de membrana com sítios de ligação específicos, (d) matriz extracelular circundante com componentes em escala nanométrica......26

Figura 13: Difratograma de RX de nanotubos de titânio tratados em diferentes temperaturas mostrando diferentes picos que indicam a presença de titânio, fase anatase e fase rutilo.......42

Figura 18: Viabilidade Celular por CellTiter-Blue®. Dados mostram a densidade óptica de redução do reagente Alamar Blue por cultura por 1, 4 e 7 dias em TiO₂ plano e nanotubos de TiO₂ recozidos a diferentes temperaturas. Os resultados são apresentados como média \pm DP em quintuplicata (n = 5). Análise por one-way ANOVA e teste de Tukey HDS para comparações múltiplas. (**) para p <0,01 e (***) para p <0,001. Quando não indicado pelas linhas tracejadas, a análise estatística se refere à comparação com o controle Ti para cada dia de ensaio..........47

Figura 20: Análise do número de células, cobertura do citoesqueleto e forma das células após 1, 4 e 7 dias de cultura em TiO₂ plana e nanotubos de TiO₂, recozidos a diferentes temperaturas. (A) Contagem das células usando a marcação dos núcleos com DAPI (Ensaio realizado em triplicata com a contagem de 3 campos por amostra, n = 9). (B) Cobertura celular pela quantificação do citoesqueleto (filamentos de actina) determinada pela análise da marcação com rodamina-faloidina (triplicata com a contagem de 3 campos por amostra, n = 9). (C) Shape factor. O alongamento celular foi caracterizado pela relação largura / comprimento das imagens fluorescentes, os resultados = 1 representam as células esféricas e os resultados <1 representam as células alongadas (n = 5). Os resultados são apresentados como média \pm DP e a análise estatística foi realizada por ANOVA e as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey HDS (A e B) e pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para análise de amostras

Figura 28: (A) Imagens de imunofluorescência (10x) de ADSCs coradas com DAPI, rodamina / faloidina e FITC em matrizes de nanotubos de titânia recozidas a diferentes temperaturas após 1, 2 e 3 semanas de cultura. A coloração em verde representa a marcação de osteopontina por ADSCs. (B) Porcentagem de osteopontina marcada com FITC normalizada pelo número total de células em uma imagem. Os resultados são apresentados como média ± DP (n = 5). (**) p <0,01,

Figura 30: Imagens representativas de SEM (50.000x) de ADSCs em matrizes de nanotubos de titânio tratados a diferentes temperaturas após 1, 2 e 3 semanas de cultura em meio osteogênico.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de Elementos Químicos presentes no Ti cp e liga TiAl4V6. O teor de cadaíon é dado em porcentagem e o balanço corresponde ao teor de Ti para um total de 100% nacomposição do material.16

Tabela 2: Visão geral dos métodos mecânicos, físicos e químicos utilizados para modificaçãosuperficial de Ti e TiO218

1. INTRODUÇÃO

A colocação de próteses ortopédicas tem melhorado a qualidade de vida de milhões de pessoas no mundo todo. Estima-se, por exemplo, que pelo menos 4,5 milhões de pessoas possuem prótese de quadril e 6,7 milhões possuem prótese de joelho. No entanto verifica-se um aumento simultâneo no número de cirurgias de revisão de implantes, com uma projeção de aumento em 137% e 607% no número total de cirurgias de revisão no quadril e no joelho, respectivamente, entre os anos de 2005 e 2030 (Puelo 2004; Kurtz 2007; Kremers et al. 2015).

Uma das principais causas de cirurgias de revisão é a corrosão de materiais metálicos (Manivasagam Geetha, Durgalakshmi, and Asokamani 2010), causado pelo contato do material com componentes do sangue e outros fluidos corporais (J Yu, Zhao, and Li 1993). Para superar estes problemas, modificações na superfície do implante, tem sido frequentemente realizadas com o intuito de diminuir a corrosão e melhorar a biocompatibilidade (Kiradzhiyska et al. 2016). Novos materiais bioativos precisam ser testados primeiramente em diferentes modelos celulares *in vitro*, para a identificação do potencial de estimulação da osseointegração e dos mecanismos envolvidos na interação célula-biomaterial.

1.1. BIOMATERIAIS

Um biomaterial pode ser definido como todo material de origem natural ou sintética, utilizado por tempo indeterminado na substituição total, parcial ou ainda na reparação de tecidos vivos danificados, estrutura biológica perdida ou doente, buscando restabelecer sua forma e a função (Geetha et al. 2009). Representam uma significativa parcela dos produtos utilizados na área da saúde. São dispositivos médicos, como os biossensores, tubos para circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise, e também os materiais implantáveis, como os fios de sutura, placas, substitutos ósseos, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, implantes dentários. Há ainda dispositivos para a liberação de medicamentos na forma de partículas e implantes subdérmicos. Por fim,

pode-se citar os órgãos artificiais, como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões e pele (Pires, Bierhalz, Moraes 2015).

Historicamente, o uso de materiais tem seu início na Antiguidade há 5.000 anos, com registros de uso de conchas esculpidas para substituição de dentes no Antigo Egito (K. Chan, Zhuo, Ni 2013), e relatos do uso de ouro para substituição de dentes em civilizações chinesas e astecas há 2.000 anos (Ratner, Hoffman, Lemons 2006). O primeiro relato de transplante ósseo ocorreu na Era Moderna, em 1682, mas somente em meados do século XX passou a existir uma melhor sistematização dos conceitos. O termo osseointegração foi criado em 1952 (Edalat 2012; Hildebrand 2013) em 1976 foi criada a primeira definição de Biomaterial, e em 1987 surgiu o termo Engenharia de Tecidos (Africa et al. 2003).

1.1.1. CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com sua composição, sendo polímeros, cerâmicos, compósitos e metais. Os polímeros são representados por dois grupos: polímeros naturais e sintéticos. Os naturais são polissacarídeos, polinucleotídeos ou proteínas, e apresentam melhor interação com as células dos tecidos que recebem os implantes (Holzapfel et al. 2013). Os polímeros sintéticos representam o maior grupo de polímeros biodegradáveis e podem ser produzidos em condições controladas. Dentre estes destacam-se as poliamidas, polietileno, polipropileno, poliacrilatos, fluorocarbonos, poliésteres e poliéteres, poliuretanos (Heath et al. 2013; Tian et al. 2012).

As cerâmicas podem ser classificadas de acordo com a sua interação com o tecido hospedeiro como bioinertes, bioativas e bioreabsorvíveis. As bioinertes, como a alumina e a zircônia, mantêm suas propriedades físicas e mecânicas enquanto implantada e são bem toleradas pelo organismo. As cerâmicas bioativas interagem com o tecido circundante, estimulam o sistema tissular a responder ao material como se este fosse um tecido natural. Como exemplos desta classe, destacam-se a hidroxiapatita, os biovidros e as vitrocerâmicas. Os materiais bioabsorvíveis participam do processo metabólico do organismo e apresentam a característica de sofrerem degradação por ações químicas ou biológicas, sendo lentamente substituídos por células em crescimento. São também estáveis à longo prazo e minimizam a possibilidade de perda do implante. O fosfato tricálcico e o gesso estão incluídos nesta classe de cerâmicas (Drouet et al. 2017).

Os compósitos são uma classe de materiais constituídos por duas fases (ou combinação de dois ou mais materiais), cujas características podem incorporar propriedades combinadas dos constituintes individuais. Esta combinação visa a modificação das propriedades originais dos materiais para melhorar as propriedades mecânicas, biocompatibilidade e bioatividade, aumentar a taxa de degradação, ou até mesmo, controlar o perfil de liberação de fármacos ou fatores de crescimento incorporados aos dispositivos. De forma geral, os compósitos apresentam grande potencial para aplicação como biomateriais e estão em crescente desenvolvimento, uma vez que possibilitam ajustar o desempenho mecânico e biológico para diversas situações clínicas específicas (M. Wang 2003; Habraken, Wolke, Jansen 2007; Kamitakahara, Ohtsuki, Miyazaki 2008). Por fim, os metais destacam-se como matérias-primas de biomateriais. Suas propriedades os tornam materiais de escolha para o desenvolvimento de componentes estruturais, visando a substituição, reforço ou estabilização de tecidos rígidos (Niinomi 2008). Apresentam excelentes propriedades mecânicas, quando comparados com cerâmica ou plástico, e podem ser, por exemplo, ligas de aço inoxidável, titânio, ouro, prata e cobalto. Entretanto, o corpo humano tem um ambiente interno fortemente corrosivo, o que pode provocar danos no material metálico implantado, tais como corrosão, fadiga associada a corrosão (Hussein, Mohammed, Al-Aqeeli 2015).

1.2. TITÂNIO

O titânio (Ti) e suas ligas estão entre os biomateriais mais utilizados para aplicações médicas e odontológicas, devido à sua elevada biocompatibilidade, baixa densidade, baixo módulo de elasticidade e alta resistência à corrosão (Niinomi 2008; Pires, Bierhalz, Moraes 2015). O titânio comercialmente puro (Ti cp) é classificado pela

15

Sociedade Americana de Testes e Materiais (American Society of Testing and Materials 2005) em 5 graus que diferem em seu teor de oxigênio, ferro e outros elementos químicos (Tabela 1). O oxigênio atua como um agente endurecedor e mantém a microestrutura na fase α , enquanto o ferro é um refinador dos grãos da fase β e diminui o endurecimento do material.

Tabela 1: Composição de Elementos Químicos presentes no Ti cp e liga TiAl4V6. O teor de cada íon é dado em porcentagem e o balanço corresponde ao teor de Ti para um total de 100% na composição do material.

Elemento	Ti Grau 1	Ti Grau 2	Ti Grau 3	Ti Grau 4	TiAl6V4 máx.
Nitrogênio	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05
Carbono	0,08	0,08	0,08	0,08	0,10
Hidrogênio	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Ferro	0,20	0,30	0,50	_	0,30
Oxigênio	0,18	0,25	0,35	0,40	0,20
Alumínio	_	_	_	_	5,5 – 6,50
Vanádio	_	_	_	_	3,5 – 4,5
Titânio	Balanço	Balanço	Balanço	Balanço	Balanço

Fonte: Adaptado de fwmetals.com/materials/titanium/cp-titanium/ e fwmetals.com/materials/titanium/ti-6al-4v-eli/

O Ti cp grau 1 possui as menores concentrações de oxigênio intersticial e ferro residual. Apresenta a menor resistência mecânica, porém alta ductilidade e facilidade para trabalho a frio. O Ti cp grau 2 é amplamente utilizado pela indústria em virtude de suas propriedades equilibradas de resistência mecânica, semelhante ao aço inoxidável comum, e ductilidade, além de ser facilmente trabalhado a frio. O Ti cp grau 3 possui resistência mecânica um pouco maior que o grau 2, em razão da maior concentração de oxigênio e nitrogênio intersticial, porém sua ductilidade está abaixo dos demais. O Ti cp grau 4 apresenta a maior resistência mecânica do grupo do titânio puro e é mais utilizado em implantes dentários (Mas Handbook 2005).

Além das variações referentes ao grau de oxigênio, o titânio tem sido utilizado como elemento base para a formação de ligas juntamente com outros elementos químicos, como o alumínio e o vanádio (liga Ti-6AI-4V), com a finalidade de melhorar a

resistência mecânica (Pires, Bierhalz, Moraes 2015). A escolha entre um dos diferentes graus de titânio e as ligas com diferentes metais, depende das propriedades mecânicas desejadas para cada aplicação. Atualmente o Ti cp é o material dominante usado para implantes dentários (K. Wang 1996), enquanto que a liga Ti-6Al-4V é usada para aplicações ortopédicas (M. Geetha et al. 2009b). No entanto, estudo recente evidenciou que, sob condições experimentais, o Ti cp e Ti-6Al-4V demonstraram osseointegração e ancoragem biomecânica semelhantes (Shah et al. 2016).

Outra propriedade do titânio é a alta afinidade pelo oxigênio, o que leva a formação espontânea de uma camada de óxido superficial amorfa (TiO₂) (Hanawa, Asami, Asaoka 1998). Esta camada, quando na superfície de implantes, apresenta-se aderente e estável ao ambiente corporal, conferindo excelente biocompatibilidade (Shah et al. 2016) e favorece a osseointegração (Sul et al. 2001).

1.2.1. MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO

Para que ocorra uma boa integração osso-implante a curto e a longo prazo, a geometria e grafia da superfície do implante são importantes. Geralmente, as superfícies em micro e nanoescala possuem energia superficial, levando ao aumento da adsorção inicial de proteínas que, por sua vez, influencia diretamente na adesão de células, favorecendo o processo de osseointegração (Diebold 2003; PUCKETT et al. 2010). Modificações em micro e nanoescala podem ser alcançadas por meio de diferentes métodos, destacando-se: métodos mecânicos, físicos e químicos (Tabela 2) (Kulkarni et al. 2014). Dentre os métodos mecânicos destacam-se: jateamento com vários tipos e tamanhos de abrasivos e atrito para obtenção de materiais monofásicos. Os métodos físicos são representados por revestimentos de titânio pulverizados por plasma. E os métodos químicos condicionamento ácido e processos eletroquímicos. Pode-se ainda, realizar a combinação desses métodos (Le Guéhennec et al. 2007).

Tabela 2: Visão geral dos métodos mecânicos, físicos e químicos utilizados para modificação superficial de Ti e TiO₂

	Métodos	Modificação na Camada	Objetivo	
Med	ânicos			
•	Esmerilhamento Polimento Usinagem Jateamento	Superfície rugosa ou lisa formada pelo processo de subtração	 Produzir topografias de superfície específicas; limpar e aplainar a superfície; melhorar a adesão na colagem. 	
•	Atrito	Camadas superficiais em titânio comercialmente puro que melhoram as propriedades de tração e dureza superficial do titânio	 Produzir materiais com grãos de tamanho nanométrico (1-100nm); produzir morfologia rugosa com maior hidrofilicidade. 	
Físi	cos			
• • •	Pulverização térmica Pulverização por chama Pulverização por plasma Pulverização oxi- combustível de alta velocidade	~ 30 a ~ 200µm de revestimentos, como titânio, HA, silicato de cálcio, Al₂O ₃ , ZrO ₂ , TiO ₂	 Melhorar a resistência ao desgaste; resistência à corrosão e propriedades biológicas. 	
•	Deposição física de vapor Evaporação Chapeamento de íons Sputtering	~ 1μm de TiN, TiC, TiCN, diamante e revestimento de hidroxiapatita de película fina de carbono semelhante a diamante por sputtering	 Melhorar a resistência ao desgaste, resistência à corrosão e compatibilidade do sangue. 	
•	Implantação e Deposição de Íon	~ 10 nm de camada de superfície modificada e / ou um de filme fino	 Modificar a composição da superfície; melhorar o desgaste, resistência à corrosão e biocompatibilidade. 	
•	Tratamento de Plasma de Descarga de Brilho	~ 1nm a ~ 100 nm de camada modificada superficialmente	 Limpar, esterilizar ou oxidar a superfície; nitretação superficial; remoção da camada de óxido nativo 	
Quí	micos			
•	Tratamento Químico TratamentoÁcido	<10 nm de camada de óxido de superfície	 Remover as escamas de óxido e contaminação. Melhorar a biocompatibilidade, a 	
•	Tratamento Alcalino	~ 1µm de titanato de sódio gel	bioatividade ou a condutividade óssea.	
•	Tratamento por Peróxido de Hidrogênio	~ 5 nm de óxido interno denso e camada externa porosa		
•	Sol-gel	~ 10µm de filme fino, como fosfato de cálcio, TiO2 e sílica	 Melhorar a biocompatibilidade, a bioatividade ou a condutividade óssea 	
•	CVD	~ 1μm de TiN, TiC, TiCN, diamante e película fina de carbono semelhante a diamante	 Melhorar a resistência ao desgaste, resistência à corrosão e compatibilidade do sangue 	
•	Métodos Bioquímicos	Deposição de revestimento Modificação através de titânia silanizada, fotoquímica, monocamadas auto-organizadas, resistência a proteínas, etc.	 Induzir resposta celular e tecidual específica por meio de peptídeos, proteínas ou fatores de crescimento imobilizados na superfície 	
•	Oxidação Anódica	~ 10 nm a 40μm de camada de TiO ₂ , adsorção e incorporação de ânions eletrolíticos	 Produzir topografias de superfície específicas; melhorar a resistência à corrosão; melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou condutividade óssea 	

Fonte: Adaptado de Kulkarni, 2014.

1.2.2. NANOTUBOS DE TIO₂

A anodização eletroquímica é um método fácil e relativamente de baixo custo para modificação da superfície da camada passiva de TiO₂ e produção de nanotubos. Esta técnica foi relatada pela primeira vez por Gong et al. em 2001 para preparar arranjos nanotubulares de titânio auto-organizados usando oxidação anódica de um substrato de titânio em 0,5 a 3,5% (p/v) de solução aquosa de ácido fluorídrico (Gong et al. 2001). Depois disso, muitos pesquisadores exploraram a técnica como sua principal escolha para fabricar estruturas nanotubulares que variam em diâmetro (15 nm até 300 nm) e comprimento (Galstyan et al. 2011; Macák, Tsuchiya, Schmuki 2005; Smith et al. 2011). A Figura 1 ilustra a morfologia de nanoporos (d, f) e nanotubos (a, b, c, e) formados por anodização eletroquímica que foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).



Figura 1: Imagens obtidas por MEV de nanotubos de TiO₂ de diferentes diâmetros: a) 15 nm, b) 50 nm, c) 100 nm, e de nanoporos de TiO₂: d) 15 nm. Imagens transversais e vista superior das nanoestruturas ao longo da seção transversal de e) nanotubos de TiO₂ e f) nanoporos de TiO₂. Fonte: Kulkarni, 2014.

Os parâmetros como diâmetro, espessura e comprimento dos nanotubos de TiO₂ podem ser controlados pelo potencial, composição eletrolítica, concentração, pH e tempo de anodização (Rani et al. 2010). Como demonstrado na Figura 2, o sistema compreende um polo positivo (ânodo) em que pode ser acoplado o titânio, e um polo negativo (cátodo) em que pode ser acoplado o titânio, e um polo negativo (cátodo) em que pode ser acoplada o titânio. Este sistema imerso em uma solução eletrolítica é a base para a anodização. O circuito conectado a uma fonte de potência permite a formação de estruturas tubulares.





Fonte: Adaptado de Sorkin et al., 2015

O mecanismo de crescimento, evidenciado na Figura 3, é um ataque seletivo envolvendo uma formação anódica de óxido de titânio, seguida pela dissolução química como um complexo hexafluorotitanato solúvel e interação do complexo com a camada de óxido de titânio(Galstyan et al. 2014; Bavykin Walsh 2009). Desta forma, dependendo dos parâmetros utilizados no processo de anodização, é possível controlar e ajustar as propriedades (comprimento, espessura, diâmetro) dos nanotubos a serem formados.



Figura 3: Processo de formação de nanotubos de TiO₂. (a) Camada compacta inicial de TiO₂ formada por anodização. (b) ataque por F- e propagação de TiO₂ no substrato. (c) camada de poros desorganizada é formada com lacunas preenchidas. (c) Na presença de água suficiente, o interior é dissolvido e tubos separados são formados.

Fonte: Tsui and Zangari, 2014

1.2.3. MODIFICAÇÃO DA FASE CRISTALINA DE NANOTUBOS DE TIO2

O titânio está presente na natureza sob diferentes formas cristalinas: anatase, rutilo e bruquita (Figura 4). Entre elas, o rutilo é a fase mais estável, e todas as outras fases metaestáveis podem se transformar nesta forma estável a alta temperatura (Koparde, Cummings 2008; Sanz et al. 2012) Estudos recentes demonstraram que, da mesma forma, é possível alterar a fase cristalina de superfícies nanoestruturadas por meio de tratamento térmico. Em geral, nanotubos tratados a 300 e 400°C apresentam a fase anatase, enquanto que temperaturas acima de 600°C apresentam as fases anatase / rutilo, formando apenas rutilo para tratamento acima de 680°C (Varghese et al. 2003; Liu, Zhang 2009; Mohan, Anandan, Rajendran 2015).



Figura 4: Estrutura celular unitária esquemática das fases cristalográficas de TiO₂. Fonte: Adaptado de Damodaran et al., 2015

1.3. CARACTERÍSTICAS DA SUPERFÍCIE DOS NANOTUBOS DE TIO2 E COMPORTAMENTO CELULAR

Diversos estudos já demonstraram que as características morfológicas das superfícies nanoestruturadas de titânio afetam o comportamento celular, no que diz respeito à adesão, proliferação e diferenciação. Os modelos celulares mais utilizados foram osteoblastos, fibroblastos, condrócitos, células endoteliais, miócitos, queratinócitos e células-tronco mesenquimais (MSC) (Song et al. 2016; Cheng et al. 2018).

Nanotubos com diâmetro pequeno (cerca de 30 nm) são descritos como favoráveis à promoção da adesão celular, enquanto que nanotubos com diâmetro maior, entre 70-100 nm, seriam capazes de induzir o elongamento celular, que eventualmente levaria ao estresse do citoesqueleto e à diferenciação de osteoblastos (W. Yang et al. 2014). Além disso, nanotubos com diâmetro menor que 30 nm são capazes de estimular a diferenciação de células tronco hematopoiéticas em osteoclastos, enquanto que a diferenciação poderia ser inibida por nanotubos com diâmetro maior que 100 nm (Seo et al. 2014). Já a adesão e proliferação de células tronco mesenquimais humanas (MSCh) podem ser observadas quando em contato com nanotubos com diâmetro de aproximadamente 30 nm, com diferenciação muito baixa (Brammer et al. 2009). Adicionalmente, maior elongamento e maior taxa de diferenciação de MSCh foram observados em nanotubos de maior diâmetro (aproximadamente 100 nm) (Figura 5). A

investigação do comportamento de condrócitos em nanotubos com diâmetros de 30 a 100 nm tratados térmicamente a 500°C, indicou maior porcentagem de células redondas em nanotubos de 70 nm de diâmetro. Já a secreção de matriz extracelular foi maior em nanotubos com diâmetros entre 50 e 100 nm (Bjursten et al. 2010).



Figura 5: Ilustração esquemática das tendências gerais dos efeitos da superfície nanométrica na adesão e diferenciação de MSCh. A mudança na adesão e crescimento da célula MSCh sem diferenciação (linha vermelha sólida) tem a mesma tendência que a densidade de partículas de proteína (linha vermelha pontilhada), enquanto que a diferenciação (linha azul sólida) tem a mesma tendência de alongamento de MSCh (linha azul pontilhada).

Fonte: Adaptado de Damodaran et al., 2015.

A fase cristalina dos nanotubos de TiO₂ também tem impacto na sua bioperformance (Mazare et al. 2012), mas ainda com efeitos controversos e pouco compreendidos. Células endoteliais tiveram número significativamente diminuído após três dias de cultura em contato com superfícies contendo a fase anatase, quando comparado com nanotubos amorfo (Park et al. 2007). Da mesma forma, células-tronco mesenquimais mostraram maior adesão e taxa de proliferação na superfície de nanotubos de TiO₂ amorfos (Bai et al. 2011). Por outro lado, a taxa de proliferação e crescimento de osteoblastos em nanotubos amorfos diminuiu ligeiramente em comparação com as fases rutilo e amorfa (Oh et al. 2005). Nanotubos tratados térmicamente a 450°C, 550°C e 650°C por 3 h, contendo uma mistura da fase anatase e rutilo, tiveram efeito máximo sobre proliferação, espalhamento e mineralização de préosteoblastos (Jiaguo Yu, Wang 2010). Há também resultados que apontam que rutilo e

anatase são mais vantajosos na formação de hidroxiapatita, uma característica do tecido ósseo diferenciado (An et al. 2011).

Outro parâmetro que afeta a bioatividade do TiO₂ é a molhabilidade da superfície. A medida do ângulo de contato, gerado a partir da deposição de determinado líquido sobre a superfície, é uma maneira de se avaliar essa propriedade, como demonstrado na Figura 6. Estudos recentes demonstraram que superfícies hidrofílicas são capazes de aumentar a adesão e proliferação celular em comparação com superfícies hidrofóbicas (Kulkarni et al. 2014). Isso ocorre de duas maneiras: pela conexão físico-química direta entre a célula e a superfície do material e pelo efeito indireto na adesão celular por meio do ajuste da adsorção de proteínas (Wilson et al. 2005). A elevada energia de superfície de nanotubos de TiO₂ aumenta a adsorção de proteínas, quando comparada com o titânio liso.



Figura 6: Representação esquemática da medida de ângulo de contato de um líquido depositado sobre uma superfície sólida. Fonte:https://docplayer.com.br/46077865-Interfaces-gas-liquido-liquido-liquido.html.

1.4. RESPOSTA CELULAR E OSSEOINTEGRAÇÃO

O tecido ósseo possui uma organização hierárquica que abrange várias ordens de grandeza, desde a macro até a nanoescala (Figura 7). Macroscopicamente, pode se apresentar como compacto, na região mais periférica, denominada cortical, e esponjoso ou trabecular, na porção central, com rede de trabéculas contendo espaços intercomunicantes que abrigam a medula óssea. As superfícies ósseas internas e externas são revestidas respectivamente pelo endósteo e pelo periósteo, este último constitui uma membrana de grande importância para a integridade dos ossos (Katchburian, Arana 2004). Quanto à organização da matriz extracelular o tecido ósseo pode ser classificado em primário (imaturo), que se apresenta com disposição irregular, não organizada das fibras colágenas e menor quantidade de cristais de hidroxiapatita, ou secundário (maduro ou lamelar), com fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas em torno dos ósteons, formando osso compacto ou esponjoso. Em todos os casos, o tecido exibe quatro tipos de células: osteoblastos, células de revestimento ósseo, osteócitos e osteoclastos (Buckwalter et al. 1996; Downey, Siegel 2006). Apesar de sua aparência inerte, o osso é um órgão altamente dinâmico que é continuamente reabsorvido por osteoclastos e neoformado por osteoblastos. Há evidências de que os osteócitos atuam como mecanossensores e orquestradores deste processo de remodelação óssea (Clarke 2008).



Figura 7: Organização hierárquica do tecido ósseo em diferentes escalas. (a) camada compacta externa, (b) ósteons, (c) célula residente expondo receptores de membrana com sítios de ligação específicos, (d) matriz extracelular circundante com componentes em escala nanométrica. Fonte: Adaptado de Stevens M, 2008.

O sucesso na colocação de um implante ortopédico depende da forma como o este interage e estimula o tecido ósseo e tecidos adjacentes a incorporar o novo material. De modo geral o primeiro evento que ocorre após a implantação é a hidratação e a adsorção de proteínas do sangue e outros fluidos corpóreos (Figura 8 A, B). Durante o processo inflamatório subsequente, os mediadores da inflamação tais como citocinas e prostaglandinas estimulam a atração de células mesenquimais que se diferenciam em osteoblastos, que, por sua vez devem ser capazes de proliferar e secretar matriz extracelular para que ocorra o processo de mineralização do osso (Figura 8 C, D) (Mavrogenis et al. 2009).



Figura 8: Esquema dos eventos sucessivos em superfícies de biomateriais depois da implantação; a) Formação de camada água e íons; b) Adsorção de proteínas; (c) adesão / disseminação celular e (d) diferenciação / formação de tecido. Fonte: Adaptado deTagaya et al, 2012.

Além dos componentes celulares, o tecido ósseo é constituído de aproximadamente 70% de minerais, 20% de matriz orgânica e cerca de 10% de água (Rath et al. 2000). A fase orgânica, também chamada de osteóide, é principalmente constituída de moléculas fibrilares contendo estruturas proteicas aderentes como glicosaminoglicanos, proteoglicanos, pequenas proteínas não colágenas e alguns lipídeos (Topptes et al. 2004).

As principais proteínas não colagenosas no osso são osteocalcina, osteonectina e osteopontina, sendo a osteocalcina a mais abundante (Grafenau, Lepage 2000). Após a fase proliferativa dos osteoblastos, a fosfatase alcalina é primeira a ser expressa, enquanto que a osteocalcina e osteopontina são sintetizadas quando a matriz óssea começa a mineralizar (Stein, Lian 1990).

Os osteoblastos produzem dois mícrons cúbicos de matriz extracelular por dia até a formação de uma camada com cerca de 10-15 mícrons de espessura (Toppets et al., 2004). A mineralização começa 5-10 dias após a deposição do osteóide (Boivin and Meunier 2003). Este processo envolve duas etapas: a nucleação de cristais de fosfato de cálcio, seguida do crescimento destes cristais (Figura 9) (Ottani et al. 2002). A nucleação dos cristais necessita de concentrações saturadas de Ca2+ e PO43- no fluido intersticial, enquanto que a saturação é obtida através do aprisionamento de Ca2+ extracelular por osteocalcina e vesículas contendo fosfatase alcalina.





Fonte: https://www.google.com.br/search?q=imagens&es sm

A nucleação dos cristais leva à formação de hidroxiapatita estável (HAP), cuja estrutura tridimensional proporciona uma grande área de interface entre os cristais de HAP e do fluido intersticial (Toppets et al. 2004). As lacunas paralelas entre as fibras de colágeno são preenchidas pela nucleação dos cristais inorgânicos (Ottani et al. 2002). Um resumo do processo de mineralização está representado na Figura 10.



Figura 10: Representação do processo de Mineralização do tecido ósseo: Osteoblastos secretando vesícula, formação da camada osteóide e o osso mineralizado. Fonte: Lee W. Janson, Marc E. Tischer: The Big Picture: Medical Biochemistry.

O desenvolvimento de novos biomateriais, caracterizados como bioativos, implica no estudo da interação célula-material. Para que ocorra uma osseointegração rápida e duradoura o material deve ser capaz de estimular a adesão, proliferação e diferenciação de células osteogênicas, além de favorecer a atuação de células responsáveis pela formação de matriz extracelular, importante para a manutenção do tecido ao redor do implante. Para o melhoramento da resposta biológica, modificações na superfície de implantes têm revelado resultados promissores. Sabe-se que a modificação na fase cristalina em nanotubos de TiO₂, melhora a resistência a corrosão e estimula a adesão e proliferação de osteoblastos, bem como atua na ativação de plaquetas. O presente estudo vem no sentido de testar a modificação da fase cristalina de nanotubos de TiO₂ na adesão e proliferação de ADSCs e fibroblastos, bem como a diferenciação de osteoblastos para a avaliar a capacidade de mineralização do tecido.

2. JUSTIFICATIVA

O crescente número de realização de cirurgias para a colocação de próteses e implantes, e ainda, o crescente número de cirurgias de revisão, justificam a busca por novos materiais bioativos. A nova geração de biomateriais aumentam a capacidade de interagir com os tecidos corporais em nível molecular, estimulando as células no processo de osseointegração.

O titânio é um material bem descrito pelas suas propriedades mecânicas e por ser biocompatível. Além disso, a modificação da superfície do titânio tem demonstrado resultados promissores no processo de osseointegração. Com o avanço da nanotecnologia é possível desenvolver dispositivos em escala nanométrica, contendo em sua superfície nanotubos de TiO₂, por exemplo, capazes de estimular a interação de células e moléculas com o biomaterial. A formação de nanotubos é possível por meio de técnicas como a anodização, esta técnica caracteriza-se por ser de fácil execução, além de ser economicamente viável.

No entanto, a modificação da fase cristalina, realizada por meio do tratamento térmico, apesar de ser de fácil execução e melhorar as propriedades físicas do material, tem sido pouco estudada do ponto de vista biológico. Este trabalho vem no sentido de aprimorar a resposta de diferentes modelos celulares, envolvidos no processo de osseointegração, por meio da modificação da fase cristalina em nanotubos de TiO₂ visando o desenvolvimento de próteses e implantes bioestimulantes.
3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar o efeito do tratamento térmico de nanotubos de óxido de titânio, no comportamento de fibroblastos, osteoblastos e células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC), visando o desenvolvimento de material bioativo para aplicação ortopédica e odontológica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar superfícies de TiO₂, contendo nanotubos e diferentes fases cristalinas.
- Caracterizar as superfícies de titânio contendo nanotubos de TiO₂ quanto a morfologia, cristalinidade, molhabilidade e adsorção de proteínas.
- Investigar o efeito da arquitetura da camada de nanotubos de TiO₂ com diferentes estruturas cristalinas na adesão de fibroblastos e osteoblastos e ADSCs.
- Avaliar a influência da camada de nanotubos de TiO₂ com diferentes estruturas cristalinas na indução da proliferação de fibroblastos, osteoblastos e ADSCs.
- Estabelecer a influência da arquitetura da camada de nanotubos de TiO₂ com diferentes estruturas cristalinas na diferenciação osteogênica de ADSCs.
- Determinar o potencial da camada de nanotubos de TiO₂ com diferentes estruturas cristalinas em estimular a produção de matriz óssea por osteoblastos.

4. MÉTODOS

O estudo de biocompatibilidade incluiu o preparo e caracterização das superfícies nanoestruturadas, bem como a realização de ensaios biológicos com diferentes modelos celulares, como mostrado de forma esquemática no fluxograma da Figura 11.



Figura 11: **Fluxograma do desenvolvimento experimental.** Preparo e caracterização das superfícies nanoestruturadas apresentadas sequencialmente. Diferentes ensaios biológicos realizados em etapas distintas do estudo, bem como os modelos celulares investigados em cada etapa. *LDH- Desidrogenase Lática. *ADSCs- Células Tronco Derivadas de Tecido Adiposo.

4.1. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES NANOESTRUTURADAS

A formação de nanotubos nas superfícies de titânio foi realizada conforme processo de anodização descrito anteriormente (Soares et al. 2018). Foram usadas

amostras de Ti comercialmente puro – Grau 1 (2 cm x 2,5 cm) como substrato para o crescimento de camadas de nanotubos de TiO₂.

A espessura da camada de nanotubos de TiO₂ foi controlada pelo tempo de anodização, com tensão constante de 60 V e tempo de oxidação de 6 horas. A solução do eletrólito foi preparada com 79,3% dietilenoglicol (DEG, 99 % v/v), com 0,7% de ácido fluorídrico (HF 48% v/v) e 20 % de água deionizada. Após a anodização, as amostras foram submetidas a diferentes tratamentos térmicos: 300, 530 e 630 °C por 5 horas. Em seguida, as amostras foram cortadas (6 mm x 6 mm) e lavadas com acetona, etanol 70% e água deionizada por 10 minutos em cada solvente.

Antes dos ensaios biológicos *in vitro*, as amostras foram lavadas com etanol 70% por 10 minutos, enxaguadas duas vezes com solução de PBS (Phosphate Buffered Saline) e expostas a luz Ultra Violeta por 30 minutos, em fluxo lâminar para esterilização.

4.1.1. ANÁLISE DA MORFOLOGIA

A morfologia dos nanotubos foi analisada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foram capturadas imagens a 1.000 x e 5.000 x. A partir das imagens com magnificação de 5.000 x foi realizada a medida interna do diâmetro dos nanotubos com o auxílio do software do microscópio Tescan Vega 3.

4.1.2. ANÁLISE DE ÂNGULO DE CONTATO

A molhabilidade das superfícies foi analisada usando um goniômetro (Rame-Hart 250). Foram capturadas imagens da gota de água ultra pura sobre cada superfície imediatamente após a deposição da mesma. As imagens foram analisadas para determinação do ângulo de contato. Ângulos maiores representam baixa energia de superfície e ângulos menores representam uma alta energia de superfície.

4.1.3. ANÁLISE DE ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS

A adsorção de albumina e fibrinogênio foram investigadas sobre superfície de titânio e superfícies nanoestruturadas. As superfícies foram incubadas com soluções de albumina (padrão de albumina, kit micro-BCA – Thermo Scientific) e fibrinogênio (Millipore-Corp) na concentração de 100 µg/ml por 2 horas em agitador de placa a 37 °C e 5% CO₂. Nesta etapa, algumas superfícies foram secas para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria de Fotoelétrons Raio X (XPS). As proteínas adsorvidas foram dosadas através de Kit micro-BCA (Thermo Scientific).

4.2. CULTIVO CELULAR E PREPARAÇÃO PARA OS ENSAIOS

As células tronco derivadas de tecido adiposo (ADSCs) foram mantidas com meio MEM-Alpha (GE Life Science-Hyclone), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) + 100 IU/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina, em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂, com troca do meio a cada dois dias. Em todos os ensaios biológicos as células foram desaderidas com solução de tripsina/EDTA (0,25%), lavadas por centrifugação a 280 g por 5 minutos, contadas em câmara de Neubauer (5x10³/ml) e transferidas para placas de 48 poços contendo as superfícies de titânio. A resposta celular foi avaliada quanto a viabilidade, toxicidade, adesão e proliferação, em até 7 dias após o início do plaqueamento, com troca de meio a cada dois dias para manutenção das células, que permaneceram em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂.

4.2.1. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade das células foi avaliada após 1, 4 e 7 dias em contato com as superfícies utilizando o reagente CellTiter-Blue[®] *Cell viability assay* (Promega). Após incubação com as superfícies o meio de cultivo foi aspirado e em seguida foi adicionado 300 µl de meio fresco acrescido de 30 µl da solução de (10%) CellTiter-Blue[®]. Seguiu-se nova incubação por 4 horas a 37 °C em 5% de CO₂.

Após este período, 100 µl da solução foi transferida para placa de 96 poços e a densidade óptica da solução foi quantificada a 570 e 600 nm em espectrofotômetro (FLU Ostar Omega; BMG Labtech, Durham, NC). O percentual de redução de CellTiter-Blue[®] foi calculado e descrito seguindo as instruções do fabricante (Promega).

4.2.2. ANÁLISE DE TOXICIDADE CELULAR

A citotoxicidade foi investigada 1 dia após o início do cultivo através do teste de Lactato Desidrogenase - LDH Kit-QuantiChrom. Os compostos citotóxicos comprometem frequentemente a integridade da membrana celular induzindo apoptose ou necrose. A LDH é uma enzima citosólica estável que é liberada para o ambiente extracelular quando a membrana é rompida.

Portanto, o LDH pode ser dosado para avaliar a presença de danos nos tecidos ou células. As células foram incubadas a 37 °C durante 4 horas em α-MEM e 160 µl de Reagente por poço. Após 4 h, foram transferidos 100 µl de sobrenadante para uma placa de 96 poços e a densidade óptica da solução foi mensurada a 500 nm utilizando espectrofotômetro (FLU Ostar Omega, BMG Labtech, Durham, NC).

4.2.3. ANÁLISE DA MORFOLOGIA E DENSIDADE CELULAR

Após 1, 4 e 7 dias de cultivo as células foram fixadas com solução de paraformaldeído a 3,7% e permeabilizadas com solução de Triton x-100 a 1% em PBS. Em seguida foram marcadas com rodamina-faloidina 70 nM por 25 minutos e em seguida foram acrescentados 300 nM de DAPI (núcleo) por mais 5 minutos. As células foram enxaguadas e mantidas em PBS até o momento da análise em microscópio de fluorescência (Zeiss Axioplan 2).

O número de células aderidas nas superfícies foi determinado através de imagens 10x em que os núcleos marcados com DAPI foram contados. Estas análises foram realizadas utilizando o recurso Análise de Partículas do software ImageJ. A área das células foi medida a partir de imagens 10x marcadas com rodamina-faloidina, a análise foi conduzida utilizando o recurso pixels de Máscara do software ImageJ. O fator de alongamento celular foi investigado a partir de imagens 50x em que foram avaliados a relação de largura / comprimento. Para realizar estas análises foi utilizado o recurso "Set Scale" do software ImageJ.

4.2.4. ANÁLISE DA INTERAÇÃO CÉLULA/BIOMATERIAL

Após 1, 4 e 7 dias de cultivo as células foram fixadas por solução de glutaraldeído 3% (Ted Pella), Cacodilato de Sódio 0,1 M (Alfa Aesar) e Sacarose 0,1 M (Fisher Scientific) por 45 mins, seguindo-se tratamento de desidratação com soluções de etanol em concentrações crescentes por 10 minutos cada. Após tratamento com etanol as células foram incubadas por 10 minutos com hexametildisilazane (HMDS, Sigma). Após dessecação, as superfícies contendo as células foram metalizadas com camada de ouro (10 nm) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura.

4.3. ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR E DEPOSIÇÃO DE MATRIZ ÓSSEA

4.3.1. ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

A concentração de fosfatase alcalina, enzima característica do tecido ósseo, foi mensurada utilizando-se kit comercial, seguindo-se as instruções do fabricante (ALP - Quantichrom Bioassay System). Após diferentes períodos de interação das células com as superfícies, as amostras foram lavadas com PBS e as células foram lisadas com Triton (0,2%) 100X por 20 minutos à TA. Após a lise das células 50µl desta suspenção foi transferida para placa de 96 poços onde foram acrescentados 150 µl de solução de trabalho (Kit). A análise da reação foi feita no tempo 0 e após 4 minutos a 405 nm. Para análise quantitativa foi realizado cálculo indicado pelo fabricante.

4.3.2. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A expressão de proteínas características de osteócitos (células ósseas diferenciadas) foi avaliada por imunofluorescência utilizando-se anticorpos antiosteopontina e anti-osteocalcina (Santa Cruz). As células foram fixadas com formaldeído 3,7% e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente (TA). Seguido de incubação com Triton 1% (100X em PBS) por 3 minutos.

Na sequência as células foram lavadas vezes com PBS, incubadas com BSA 10% por 30 minutos e lavadas com PBS. Foram então incubadas com os anticorpos primários Osteocalcina (1:100) e Osteopontina (1:100) por 60 minutos à TA, lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário FITC (1:200 em PBS com 1% de BSA) por 45 minutos. Lavadas com PBS, transferidas para novos poços e marcadas com Rodamina-Faloidina na concentração de 1:200 por 25 minutos. Posteriormente, foi acrescentado o marcador DAPI (105µl/ml) por mais 5 minutos. Para na sequencia serem armazenadas em PBS na ausência de luz até análise em microscópio de fluorescência.

4.3.3. DEPOSIÇÃO DE CÁLCIO

A deposição de cálcio foi avaliada através de método colorimétrico utilizando-se Kit comercial – CALCIUM REAGENT SET (TECO DIAGNOSTICS). Após os tempos de 2, 3 e 4 semanas de cultivo em meio osteogênico, as amostras foram lavadas com PBS e secas a temperatura ambiente. Para dissolução do cálcio presente, as amostras foram incubadas com 500 µl de ácido clorídrico 6M por duas horas. Após este período, 20 µl desta solução foi transferida para placa de 48 poços onde foi acrescentado 1 ml da solução de trabalho do Kit. Foram transferidos 100 µl desta solução para placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 570 nm.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados quantitativos foram apresentados usando média e desvio padrão. A significância estatística foi considerada a (*) p < 0.05, (**) p < 0,01 e (***) p< 0,001 para análises por one-way ANOVA e teste de Tukey HSD para múltiplas comparações, utilizando-se o programa SPSS versão13.0 para Windows.

5. RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados de caracterização dos nanotubos de TiO₂ produzidos por anodização eletroquímica e tratados termicamente a 300, 530 e 630 °C por 5 horas. Na sequência, são apresentados os resultados da análise de toxicidade, viabilidade e proliferação de fibroblastos. Fibroblastos são células importantes na formação de matriz extracelular através da produção de proteínas, principalmente colágeno tipo I. A interação do biomaterial com proteínas da matriz extracelular é fundamental para a estabilização do implante. Portanto, o comportamento de fibroblastos de cultura primária destaca-se na investigação da interação célulabiomaterial.

Por fim, são apresentados os resultados da análise da interação dos substratos com células tronco derivadas de tecido adiposo, quanto a toxicidade, viabilidade, proliferação e diferenciação osteogênica. Células-tronco derivadas de tecido adiposo podem ser facilmente isoladas de lipoaspirado. Este modelo celular traz inúmeras vantagens no estudo em questão, pois seu potencial osteogênico permite a investigação de todos os estágios que envolvem a osseointegração.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE TIO₂ PRODUZIDOS POR ANODIZAÇÃO ELETROQUÍMICA E RECOZIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

Neste estudo, a morfologia da superfície dos nanotubos de titânio tratadas a diferentes temperaturas foi inicialmente caracterizada por MEV. Os resultados indicaram diâmetro similar para os nanotubos obtidos após tratamento térmico a 300, 530 e 630 °C (300 nm± 0,3) e todas as superfícies com estrutura similar (Figura 12).



Figura 12: Caracterização morfológica dos nanotubos de Ti. (A) Imagens representativas MEV (1.000x e 5.000x) de nanotubos de titânio tratados em diferentes temperaturas. (B) Análise quantitativa da medida dos diâmetros dos nanotubos.

A cristalinidade dos substratos foi avaliada por Difração de Raios-X (DRX). A Figura 13 mostra os picos que representam a presença das fases anatase (A) e rutilo (R), além da presença de titânio (T) em todas as amotras. O resultado da análise por DRX indica o aparecimento da fase anatase nos nanotubos tratados a 300 e 530 °C, como evidenciado por pico indicado pela seta amarela. O aparecimento da fase rutilo foi comprovado por pico indicado pela seta vermelha em nanotubos tratados a 530 e 630 °C.



Figura 13: Difratograma de RX de nanotubos de titânio tratados em diferentes temperaturas mostrando diferentes picos que indicam a presença de titânio, fase anatase e fase rutilo.

Estudos anteriores mostraram que a característica hidrofóbica/hidrofílica da superfície do substrato influencia diretamente na adsorção de proteínas, adesão e ativação plaquetária, coagulação sanguínea e adesão celular e bacteriana (Aldabergenova et al. 2008; Mazare et al. 2012). No presente trabalho, a medida do ângulo de contato foi usada para investigar a molhabilidade dos substratos. A Figura 14A representa a deposição da gota de água sobre o controle Ti e sobre as superfícies nanoestruturadas, bem como o ângulo gerado a partir da deposição da gota. A análise quantitativa do ângulo de contato, realizada a partir da observação de várias imagens, está representada na Figura 14B. Os resultados indicam que substratos tratados a 300 e 530 °C tiveram um baixo ângulo de contato, indicando que essas superfícies tem uma alta energia de superfície. Os substratos tratados a 630 °C mostraram um ângulo de

contato maior comparados com os substratos tratados a 300 e 530 °C, similar ao controle Ti (p<0.001). Desta maneira, os resultados encontrados sugerem que o recozimento a 630 °C resultou em substratos menos hidrofílicos, comparado ao recozimento a 300 e 530 °C.



Figura 14: Medida do ângulo de contato da gota de água em matrizes de nanotubos de titânio recozidas a diferentes temperaturas. (A) Os dados apresentados são média ± DP (n = 6). Análise por one-way ANOVA e teste de Tukey HDS para comparações múltiplas. (***) para p <0,001. Quando não indicado pelas linhas tracejadas, a análise estatística se refere à diferença significativa em relação ao controle Ti. (B) Imagens representativas da gota d'água em superfícies nanoestruturadas tratadas em diferentes temperaturas.

A adsorção de proteínas é o primeiro evento que ocorre assim que um implante é inserido no corpo. Dependendo das características, as proteínas podem adsorver em diferentes densidades, conformações e orientações. Albumina (ALB) é a proteína mais abundante no sistema circulatório. Agindo como uma proteína transportadora multifuncional, está presente em uma concentração de aproximadamente 50 mg/ml no plasma (P. Roach, Farrar, Perry 2005). O fibrinogênio (FIB) é uma glicoproteína estrutural chave no processo de coagulação que se estrutura formando um coágulo de fibrina e é encontrado no sistema circulatório a uma concentração de 2,6 mg/ml (P. Roach, Farrar,

Perry 2005). Para investigar a adsorção de ALB e FIB nos diferentes substratos, a adsorção de proteínas foi quantificada usando o kit comercial micro-BCA assay. A Figura 15A, representa a adsorção de ALB e FIB no controle Ti e nas superfícies nanoestruturadas tratadas a diferentes temperaturas, através de MEV. As proteínas podem ser visualizadas recobrindo parte dos substratos. Em análise quantitativa (Figura 15B), foi possível verificar que o FIB teve uma adsorção significativamente maior nos nanotubos de titânio quando comparado ao controle Ti. Por outro lado, a quantidade de ALB adsorvida no controle titânio não teve diferença significativa quando comparado aos nanotubos de titânio.



Figura 15: (A) Imagens representativas de MEV (20,000x) da adsorção de ALB e FIB nos nanotubos de titânio recozidos a diferentes temperaturas após 2 h de exposição. (B) Adsorção quantitativa de ALB e FIB em nanotubos de titânio recozidos a diferentes temperaturas após 2 h de exposição quantificado por micro-BCA assay. Os dados estão representados como media e desvio padrão (n=5). Análise por one-way ANOVA e teste de Tukey HDS para comparações múltiplas. (***) para p <0,001.

44

As proteínas adsorvidas também foram analisadas por XPS para o C1s (Figura 16A). O espectro de alta resolução do C1s mostra picos de C-C, C-N e N-C=O para proteínas adsorvidas. Para caracterizar a presença de proteínas é importante avaliar a presença do pico amida (N-C=O), grupamento químico característico da ligação entre os aminoácidos da cadeia polipeptídica. A análise quantitativa do percentual de área dos sub-picos estão representados na Figura 16B. Os resultados dos picos relativos à presença de amida indicaram uma menor quantidade de ALB adsorvida quando comparado com FIB em todos os nanotubos de titânio.



Figura 16: (A) Representação de varredura em alta resolução de C1s para a adsorção de ALB e FIB em nanotubos de titânio recozidos a diferentes temperaturas após 2 h de exposição mostrando picos de C-C, C-N e N-C=O. (B) Percentual de C-C, C-N e N-C=O varredura em alta resolução de C1s para adsorção de ALB e FIB em nanotubos de titânio recozidos a diferentes temperaturas após 2 horas de exposição.

Os resultados de adsorção de FIB (Figura 16B) mostram que o controle Ti teve menor contribuição de N-C=O comparado aos nanotubos tratados térmicamente a 300, 530 e 630 °C, indicando que os nanotubos de titânio apresentam melhores condições para adsorção de FIB.

Por meio da análise dos resultados foi possível verificar que a anodização eletroquímica, utilizada para produção dos nanotubos de TiO₂, possibilitou a formação de nanotubos homogêneos, com diâmetros de ±300 nm, como verificado por MEV. O tratamento térmico a 300, 530 e 630 °C possibilitou a formação de diferentes fases cristalinas (Anatase e Rutilo), como observado através da análise por DRX. A análise de molhabilidade confirmou a hidrofilicidade dos substratos, investigada através do ângulo de contato. Além disso, os substratos nanoestruturados favoreceram a adsorção de fibrinogênio, como confirmado por análise de XPS.

5.2. TESTES BIOLÓGICOS COM FIBROBLASTOS

Para investigar a toxicidade dos nanotubos de TiO₂, a dosagem de LDH foi realizada após 24 h do início da cultura. LDH é uma enzima citoplasmática que está presente na maioria das células e está aumentada no espaço extracelular quando há algum dano na membrana plasmática (F. K.-M. Chan, Moriwaki, Rosa 2013). A Figura 17 mostra que as células cultivadas em controle de titânio e substratos contendo nanotubos de TiO₂ mantiveram o mesmo perfil de resposta para a reação. Nossos resultados mostram que as superfícies contendo nanotubos e modificação na fase cristalina não foram tóxicas para os fibroblastos.



Figura 17: Toxicidade celular pelo teste de LDH. Investigação da citotoxicidade de nanotubos de TiO2 recozidos a diferentes temperaturas. Os resultados são apresentados como média \pm DP (n = 5). Análise por one-way ANOVA e teste de Tukey indicaram que não há diferença entre os grupos.

A viabilidade celular foi caracterizada usando CellTiter-Blue® assay, em que células viáveis são capazes de reduzir o sal Rezasurin para Resofurin, e a quantificação desta redução é realizada por espectrofotometria (Figura 18). Os resultados mostram que houve um aumento significativo (p <0,001) na redução de sal do dia 1 ao dia 7 pelas células para todos os substratos, indicando que os substratos estimularam o metabolismo celular ao longo do tratamento. Além disso, no dia 7 houve diminuição significativa (p <0,01) da redução do sal no tratamento a 300 °C, quando comparado ao controle.



Figura 18: Viabilidade Celular por CellTiter-Blue®. Dados mostram a densidade óptica de redução do reagente Alamar Blue por cultura por 1, 4 e 7 dias em TiO₂ plano e nanotubos de TiO₂ recozidos a diferentes temperaturas. Os resultados são apresentados como média \pm DP em quintuplicata (n = 5). Análise por one-way ANOVA e teste de Tukey HDS para comparações múltiplas. (**) para p <0,01 e (***) para p <0,001. Quando não indicado pelas linhas tracejadas, a análise estatística se refere à comparação com o controle Ti para cada dia de ensaio.

Imagens de microscopia de fluorescência foram capturadas após 1, 4 e 7 dias de cultura na magnificação de 10x (Figura 19). Os núcleos foram corados com DAPI e são visualizados em azul, os filamentos de actina foram corados com Rodamina/Faloidina e são visualizados em vermelho. A partir da análise das imagens de fluorescência, com o

auxílio do software ImageJ, foi possível realizar a contagem dos núcleos, representados na Figura 20A e quantificar os filamentos de actina indicados na Figura 20B.



Figura 19: Imagens de microscopia de fluorescência. Imagens de fluorescência representativa (10x) de fibroblastos corados com DAPI e rodamina-faloidina após 1, 4 e 7 dias de cultivo em TiO₂ plano e nanotubos de TiO₂ recozidos a diferentes temperaturas.



Figura 20: Análise do número de células, cobertura do citoesqueleto e forma das células após 1, 4 e 7 dias de cultura em TiO₂ plana e nanotubos de TiO₂, recozidos a diferentes temperaturas. (A) Contagem das células usando a marcação dos núcleos com DAPI (Ensaio realizado em triplicata com a contagem de 3 campos por amostra, n = 9). (B) Cobertura celular pela quantificação do citoesqueleto (filamentos de actina) determinada pela análise da marcação com rodamina-faloidina (triplicata com a contagem de 3 campos por amostra, n = 9). (C) Shape factor. O alongamento celular foi caracterizado pela relação largura / comprimento das imagens fluorescentes, os resultados = 1 representam as células esféricas e os resultados <1 representam as células alongadas (n = 5). Os resultados são apresentados como média \pm DP e a análise estatística foi realizada por ANOVA e as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey HDS (A e B) e pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para análise de amostras

independentes (C), diferenças significativas entre grupos para (*) p <0,05, (**) p <0,01. Quando não indicado, a análise estatística se refere à comparação com o controle Ti.

Houve aumento expressivo no número de células em todos os substratos do dia 1 para o dia 7 (Figura 20A), com destaque no dia 7 para a diminuição no número de células em substratos tratados a 300°C, quando comparado ao controle de titânio. Houve ainda aumento significativo na cobertura celular no decorrer dos dias (Figura 20B) e alongamento significativo das células nos substratos tratados a 630 °C do dia 1 ao dia 7 (Figura 20C). Os resultados indicam que a estrutura cristalina modificada em nanotubos tratados a 630 °C pode estimular o elongamento dos fibroblastos. A interação entre superfície nanoestruturada e células foi investigada por MEV após 1, 4 e 7 dias de cultura (Figura 21) que permite notar o alongamento dos filopódios e grande interação celular com o substrato.

Os fibroblastos desempenham um papel importante na produção de proteínas que compõem a MEC. A adesão e proliferação são fatores importantes antes da diferenciação celular e, consequentemente, síntese da MEC. Além disso, a interação célula-material e célula-célula são condições para o desenvolvimento e remodelamento da MEC (Chou et al. 1995; Den Braber et al. 1998). A análise conjunta dos resultados da interação de fibroblastos com as superfícies contendo nanotubos de TiO₂ com diferentes estruturas cristalinas permitiu evidenciar que os substratos não foram tóxicos e permitiram a adesão e proliferação destas células, principalmente nos substratos tratados a 530 e 630 °C.



Figura 21: Imagens representativas de SEM (20.000x) de fibroblastos em matrizes de nanotubos de titânia recozidas a diferentes temperaturas após 1, 4 e 7 dias de cultura As setas amarelas indicam o prolongamento citoplasmático (filopódios).

5.3. TESTES BIOLÓGICOS COM ADSCs

Para investigar a toxicidade dos nanotubos de TiO₂ frente as ADSCs, a dosagem de LDH foi realizada após 24 h do início da cultura. A Figura 22 mostra que quando comparados ao controle Ti, os nanotubos de TiO₂ tiveram um aumento similar de LDH, sugerindo que os substratos não foram tóxicos para as células.



Figura 22: Toxicidade celular quantificada pela presença de LDH nos nanotubos de titânio recozidos a diferentes temperaturas após 24h do início da cultura. Os dados estão representados como média e desvio padrão (n=5). Análise por one-way ANOVA e teste de Tukey indicaram que não há diferença entre os grupos.

A análise da viabilidade está representada na Figura 23. Os resultados indicam que houve um aumento no percentual de redução de CellTiter-Blue® no decorrer dos dias. Após 1 dia de cultura, não foram observadas diferenças significativas entre o controle Ti e os nanotubos de titânio. Após 4 dias de cultura, houve uma diminuição significativa no percentual de redução de CellTiter-Blue® para os nanotubos de titânio recozidos a 530 °C comparado com o controle Ti (p < 0.05). Após 7 dias de cultura, houve um aumento significativo no percentual de redução de para os nanotubos de titânio recozidos a 630 °C comparado ao controle Ti (p < 0.001). Além disso, a redução do sal, em nanotubos de titânio recozidos a 300 e 530 °C (p <0,001). Estes resultados sugerem que

superfícies tratadas a 630 °C forneceram melhores condições para a metabolização do sal Rezasurin pelas células.



Figura 23: Viabilidade celular medida através de CellTiter-Blue® Teste de viabilidade cellular em nanotubos de titâniorecozidos a diferentes temperaturas após 1, 4 e 7 dias de cultura. Os dados estão representados como média e desvio padrão de dois experimentos independentes, cada um realizado em quintuplicta (n = 10). (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001 usando o teste one-way ANOVA e teste de Tukey HDS para múltiplas comparações. Quando não indicado, a análise estatística se refere à comparação com o controle Ti.

A adesão e proliferação celular foram avaliadas por meio de microscopia de fluorescência pela marcação das células com rodamina/faloidina e DAPI após 1, 4 e 7 dias de cultura em nanotubos de TiO₂ tratados a 300, 530 e 630 °C e Ti controle. A Figura 24 indica o núcleo das células marcados em azul (DAPI) e os filamentos de actina presentes no citoesqueleto marcados em vermelho (rodamina/faloidina). A análise da figura permite concluir que houve um crescimento celular acentuado no decorrer dos 7 dias de cultura para todas as condições experimentais.



Figura 24: Imagem de Microscopia de Fluorescência (10x) de ADSCs marcadas com DAPI a rodamina/faloidina em nanotubos de titânio recozidos a diferentes temperaturas após 1, 4 e 7 dias de cultura.

A análise quantitativa do número de células (Figura 25A) mostrou um crescimento exponencial comparando o dia 1 com o dia 7, para todos os tratamentos. A análise do dia 7 evidenciou um aumento significativo do número de células sobre os nanotubos tratados a 530 e 630 °C quando comparados ao controle titânio (p<0.001).









Figura 25: (A) Contagem de ADSC em nanotubos de titânio recozidos a diferentes temperaturas após 1, 4 e 7 dias de cultura. (B) Cobertura de ADSC em nanotubos de titânio recozidos a diferentes temperaturas após 1, 4 e 7 dias de cultura. Para (A e B) Os dados estão apresentados como média e desvio padrão de dois experimentos independentes (n = 5). (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0,001. (C) Shape fator de ADSC em nanotubos de titânio recozidos a diferentes temperaturas após 1, 4 e 7 dias de cultura. Shape fator = largura da célula/comprimento da célula. Shape fator = 1 representa células esféricas e shape fator = 0 representa células alongadas. Os dados estão representados como média e desvio padrão de três experimentos independentes (n = 9). (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001. Todas as análises foram realizadas usando o teste one-way ANOVA e teste de Tukey HDS para múltiplas comparações, SPSS 13.0 software. Quando não indicado, a análise estatística se refere à comparação com o controle *Ti*.

A Figura 25B em associação com a Figura 24 mostrou que houve aumento significativo da cobertura celular após 7 dias de cultura em nanotubos de titânio recozidos a 530 e 630 °C comparado com os outros substratos (p < 0.05).

Para investigar o *shape factor*, imagens com magnificação de 50x foram analisadas com o auxílio do software ImageJ para determinar a razão da largura e comprimento das células (Figura 25C). Os resultados indicaram que após 1 dia de cultura, o aumento da temperatura de recozimento resultou em um shape fator próximo de 0, indicando que a cristalinidade não influenciou somente na adesão e proliferação celular, mas também na forma das células. Houve uma diferença significativa na forma das células sobre nanotubos recozidos a 630 e o controle Ti (p < 0.001), bem como entre nanotubos de titânio recozidos a 630 e 300 °C (p < 0.01). Estes resultados indicaram que além da proliferação, as superfícies recozidas também promoveram o elongamento celular das ADSCs.

A morfologia das ADSC sobre o titânio e nanotubos de titânio foi investigada usando MEV após 1, 4 e 7 dias de cultura. A Figura 26 mostra a membrana celular bem como o prolongamento de filopódios (indicados pelas setas) de ADSCs que ancoraram sobre os nanotubos.



Figura 26: Imagens de MEV a (50.000x) de ADSCs em nanotubos de titânio recozidos a diferentes temperaturas após 1, 4 e 7 dias de cultura. Setas amarelas indicam o prolongamento do citoplasma (filopódios) sobre os nanotubos.

Os osteoblastos são células capazes de produzir proteínas responsáveis pela formação do tecido ósseo. Entre estas proteínas, a fosfatase alcalina é a primeira a ser secretada. A fosfatase alcalina (ALP) é uma glicoproteína ligada à membrana. Sua função é catalisar a hidrólise de monoésteres de fosfato a um nível básico de pH. Sabese que a fosfatase alcalina especifica de osso (BALP) está envolvida na calcificação e proporciona um aumento na concentração de fosfato na superfície de osteoblastos durante a mineralização (Sharma, Pal, Prasad 2014).



Figura 27: Concentração de ALP produzida por ADSC após 1, 2 e 3 semanas em TiO₂ plano e nanotubos recozidos a diferentes temperaturas. Os resultados são apresentados como média \pm DP (n = 5). (**) p <0,01, (***) p <0,001 utilizando teste one-way ANOVA e Tukey HDS para comparações múltiplas, software SPSS 13.0. Quando não indicado, a análise estatística se refere à comparação com o controle Ti.

A Figura 27 mostra a análise da secreção de ALP pelas células ao longo de 3 semanas. Na semana 1 foi possível verificar que houve um ligeiro aumento na produção de ALP pelas células em contato com as superfícies nanoestruturadas, principalmente no tratamento a 630 °C. Na semana 2, observou-se discreto aumento de ALP pelas células em contato com substratos tratados a 530 e 630 °C. Comportamento semelhante foi observado na semana 3. A comparação entre as semanas revelou um aumento significativo da semana 1 para a semana 3 nas superfícies nanoestruturadas. Os

resultados indicaram que substratos contendo rutilo, recozidos a 530 e 630 °C estimularam as células a produzir e secretar ALP.

No tecido ósseo, a osteopontina (OPN) está associada com o início da mineralização, nos focos minerais da junção osteoide e às interfaces, como as lâminas limitantes (J. Chen et al. 1994; M. D. McKee, Nanci 1996; Marc D. McKee, Pedraza, Kaartinen 2011). Além disso, a OPN atua na prevenção da formação de cristais em tecidos moles e fluidos biológicos (Hunter 2013).

A presença de OPN pode ser evidenciada por meio de microscopia de imunofluorescência. Na Figura 28A o núcleo das células estão marcados em azul (DAPI), os filamentos de actina estão marcados em vermelho (Rodamina/Faloidina) e as proteínas específicas então marcadas em verde. A análise quantitativa da produção de OPN pelas células nos substratos ao longo de 3 semanas está representada na Figura 28B. Na semana 1 não houve diferença significativa entre o controle e os substratos. Na semana 2 a produção de osteopontina teve um ligeiro aumento em substratos tratados a 530 e 630 °C. Na semana 3, houve um aumento significativo de proteína em todas as superfícies nanoestruturadas, especialmente na superfície tratada a 630 °C. A comparação entre a semana 1 e a semana 3 identificou um aumento significativo em todas as superfícies nanoestruturadas (p<0.001), mas não no controle.



Figura 28: (A) Imagens de imunofluorescência (10x) de ADSCs coradas com DAPI, rodamina / faloidina e FITC em matrizes de nanotubos de titânia recozidas a diferentes temperaturas após 1, 2 e 3 semanas de cultura. A coloração em verde representa a marcação de osteopontina por ADSCs. (B) Porcentagem de osteopontina marcada com FITC normalizada pelo número total de células em uma imagem. Os resultados são apresentados como média \pm DP (n = 5). (**) p <0,01, (***) p <0,001 utilizando teste one-way ANOVA e Tukey HDS para comparações múltiplas. Quando não indicado, a análise estatística se refere à comparação com o controle Ti.

A osteocalcina (OCN) é uma proteína de baixa massa molar produzida por osteoblastos que ajuda na mineralização e é considerada um marcador tardio de diferenciação. A Figura 29B mostra a análise da produção de OCN pelas células ao longo de 3 semanas. Na semana 1 e 2 não houve diferença significativa na produção de OCN entre o controle e os substratos. No entanto, foi possível identificar um aumento significativo da proteína nas células nas superfícies tratadas a 530 °C. O aumento foi ainda mais pronunciado nos substratos tratados em 630°C. A comparação entre as semanas mostrou um aumento significativo entre as semanas 1 e 3 nas superfícies tratadas a 530 °C.



Figura 29: (A). Imagens de imunofluorescência (10x) de ADSCs coradas com DAPI, rodamina / faloidina e FITC em matrizes de nanotubos de titânia recozidas a diferentes temperaturas após 1, 2 e 3 semanas de cultura. A coloração em verde representa a marcação de osteopontina por ADSCs. (B) Porcentagem de osteocalcina marcada com FITC normalizada pelo número total de células em uma imagem. Os resultados são apresentados como média ± DP (n = 5). (**) p <0,01, (***) p <0,001 usando teste one-way ANOVA e Tukey HDS para comparações múltiplas. Quando não indicado, a análise estatística se refere à comparação com o controle Ti.

A mineralização foi investigada por microscopia eletrônica (MEV) e pela mensuração do teor de cálcio no meio de cultura. A Figura 30 mostra a análise microscópica de células no controle Ti e nos nanotubos de TiO₂ tratados a diferentes temperaturas. A imagem indica a presença de cristais formados durante as semanas, em todas as superfícies.



Figura 30: Imagens representativas de SEM (50.000x) de ADSCs em matrizes de nanotubos de titânio tratados a diferentes temperaturas após 1, 2 e 3 semanas de cultura em meio osteogênico.

A Figura 31 indica a quantificação de cálcio ao longo de 3 semanas. A comparação entre as semanas 1 e 3 é caracterizada por um aumento significativo de cálcio nas superfícies contendo nanotubos. A análise da semana 3 revelou um aumento significativamente maior na presença de cálcio na superfície tratada a 630 °C. Em associação, estes resultados indicam que superfícies tratadas a 630 °C na presença da fase anatase / rutilo foram capazes de induzir mineralização.



Figura 31: Análise de cálcio. A concentração de cálcio foi medida após 1, 2 e 3 semanas de cultivo em meio osteogênico em plano de TiO2 e os nanotubos de TiO2 recozidos a diferentes temperaturas. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de um experimento independente, realizado em quintuplicata, (n = 5). (*) p <0,05, (**) p <0,01, (***) p <0,001 utilizando teste one-way ANOVA e Tukey HDS para comparações múltiplas. Quando não indicado, a análise estatística se refere à comparação com o controle Ti.

Diante dos resultados apresentados foi possível verificar que os substratos não foram tóxicos para as ADSCs, bem como permitiram a adesão e proliferação das células ao longo dos 7 dias de cultivo. As análises de diferenciação evidenciaram um aumento significativo da produção de ALP nas células em contato com as superfícies nanoestrtuturadas ao longo das 3 semanas. Além disso, a produção de osteopontina e

osteocalcina foram acentuadamente maiores na semana 3 do estudo, nas superfícies nanoestruturadas. Por fim, a análise da dosagem de cálcio evidenciou que as superfícies contendo nanotubos de TiO₂ tratados a 630 °C induziram a mineralização.

6. DISCUSSÃO

6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE TIO2

Nanotubos de TiO₂ fabricados por anodização eletroquímica são amorfos, mas possíveis de serem modificados frente a tratamento térmico adicional, o que possibilita a transição do estado amorfo para diferentes fases cristalinas: anatase, rutilo ou a mistura de ambos (Indira et al. 2012; Zhang et al. 2018). Uma característica importante de nanotubos tratados termicamente, com modificação na fase cristalina, é o aumento de resistência à corrosão (Bai et al. 2011), fator determinante para a estabilidade e durabilidade da superfície de implantes metálicos em especial. Além disso, a alteração da fase cristalina também pode afetar a biocompatibilidade do material.

A molhabilidade é uma propriedade importante da superfície de um implante pois tem efeito sobre a sua bioatividade, mas o mecanismo desse efeito ainda não é totalmente compreendido. Estudos prévios sugerem que o tratamento térmico com formação da fase rutilo, influencia na espessura, e consequentemente no diâmetro interno dos nanotubos, alterando a rugosidade da superfície (Zhang et al. 2018), o que resultaria, segundo os autores, na diminuição da sua hidrofilicidade (G. Wang et al. 2016). No presente trabalho, a caracterização das superfícies estudadas evidenciou que o tratamento a 300 °C permitiu a formação da fase anatase, enquanto os tratamentos a 530 e 630 °C tiveram uma mistura de fase anatase e rutilo (Figura 13). Além disso, as superfícies tratadas a 300 e 530°C foram mais hidrofílicas que aquelas tratadas a 630 °C, mas a variação de temperatura não alterou o diâmetro dos nanotubos. Desta forma, diferente do encontrado anteriormente na literatura, a modificação na fase cristalina foi capaz de modificar a molhabilidade, independente do diâmetro dos nanotubos.

Além da possibilidade de conexão físico-química direta entre a célula e a superfície do material, a molhabilidade também exerce um efeito indireto na adesão celular através da adsorção de proteínas (Cheng et al. 2018). Foi reportado que superfícies contendo nanotubos apresentam elevada energia de superfície, o que aumenta a adsorção inicial de proteínas (Aldabergenova et al. 2008; Hamlekhan et al. 2014; Bai et al. 2011; Mazare et al. 2012) que, dependendo das características da

66

superfície, podem adsorver em diferentes densidades, conformações e orientações (Oliveira et al. 2015). No presente trabalho, a análise quantitativa de adsorção protéica associada à análise por XPS indicou que não houve diferença na quantidade de ALB adsorvida no Ti e nas superfícies contendo nanotubos, enquanto que a quantidade de FIB foi ligeiramente maior nas superfícies nanoestruturadas. Sabe-se que em contato com superfície de sílica a molécula de ALB (67 kDa) forma cerca de 77 pontos de ligação e a molécula de fibrinogênio (340 kDa) forma cerca de 703 pontos de ligação. No entanto, o tamanho da molécula não é o único fator a ser levado em consideração, a forma e a sequência de aminoácidos são características importantes para a interação com a superfície (Dee, Puleo, Bizios 2002; Paulina et al. 2014). Com base na forma, estrutura molecular, e a capacidade do FIB em interagir com superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas, sugerimos que de maneira semelhante como interagiu com a superfície de sílica, o FIB se ancorou nas superfícies contendo nanotubos. No entanto, a modificação na fase cristalina dos nanotubos, bem como a molhabilidade, não foram fatores relevantes para a interação do FIB com as superfícies nanoestruturadas.

6.2. ESTUDO BIOLÓGICO COM FIBROBLASTOS

A toxicidade das superfícies contendo nanotubos de TiO₂ foi investigada pela presença de LDH no meio de cultura. A desidrogenase lática (LDH) é uma enzima citosólica presente em diferentes tipos de células. Danos na membrana plasmática liberam LDH no meio de cultura celular, desta forma é possível medir a morte celular. A LDH extracelular pode ser quantificada por uma dupla reação enzimática na qual a LDH catalisa a conversão de lactato em piruvato via redução de NAD ⁺ em NADH. Na sequência a diaforase usa o NADH para reduzir o sal tetrazolium a formazan. Logo, o nível de formação de formazan é diretamente proporcional à quantidade de LDH liberada no meio, o que é indicativo de citotoxicidade (Korzeniewski, Callewaert 1983). Nossos resultados mostram que as células cultivadas no controle Ti e nas superfícies nanoestruturadas de TiO₂ mantiveram o mesmo perfil de resposta para a reação, indicando que as superfícies testadas não foram tóxicas para os fibroblastos. Sabe-se
que o titânio é amplamente utilizado como biomaterial, pois é bioinerte e não tóxico (Williams 2008; W. Q. Yu et al. 2010).

Quanto à viabilidade celular, medida pela capacidade das células em reduzir o sal resazurin à resofurin através da atividade mitocondrial, houve um aumento significativo na redução de sal do dia 1 ao dia 7 pelas células para todos os substratos. Este efeito indica que houve intensa proliferação celular ao longo de 7 dias de cultivo independente do tratamento. Verifica-se, no entanto, que no dia 7 houve menor atividade nas células cultivadas em superfícies tratadas a 300 °C, quando comparadas ao controle Ti. Esse resultado foi confirmado pela análise por microscopia de fluorescência em que o total de células foi determinado pela contagem dos núcleos marcados com DAPI.

Estudo prévio descreveu que, além da mudança na fase cristalina, o aumento da temperatura de recozimento também altera a composição química dos nanotubos (Zhang et al. 2018). Os revestimentos de nanotubos, compostos principalmente de titânio elementar e oxigênio, apresentaram diminuição na relação Ti / O à medida que as temperaturas do tratamento térmico aumentaram. Os autores observaram ainda que em temperaturas mais altas, a proporção de flúor elementar diminuiu, antes de finalmente desaparecer. Regonini e colaboradores sugeriram que o fluoreto presente nos nanotubos pode se originar da presença do elemento no eletrólito de anodização (Regonini et al. 2010). Além disso, o elemento F provavelmente reage com Ti para formar TiF4 e vaporiza para fora dos nanotubos durante o tratamento térmico a temperaturas mais altas, com a concentração de flúor insignificante nas amostras aquecidas a temperaturas acima de 400 °C (B. Yang et al. 2011). Outro estudo que avaliou a adesão e proliferação de osteoblastos em nanotubos de titânio, tratados a 450 e 600 °C, demonstraram aumento da atividade celular em substrato tratado a 600°C (Bai et al. 2011). Sugerimos que a mesma situação possa ter ocorrido com nossos substratos, indicando que o tratamento térmico a 300 °C pode não ter removido completamente os resíduos de flúor, diminuindo o metabolismo celular.

O comportamento de fibroblastos também foi analisado quanto à cobertura celular sobre as superfícies. Houve um aumento significativo na cobertura celular ao longo do período de experimentação. O tratamento a 630 °C permitiu um rápido espalhamento das células desde o dia 4, enquanto que no dia 7, as células em substrato tratado a 530 °C apresentaram maior cobertura celular. A actina é uma subunidade dos microfilamentos que participam da formação do citoesqueleto de células. É um componente chave de uma infinidade de processos celulares, incluindo a motilidade celular, sinalização e forma (Li, Duance, Blain 2007). Relatos recentes indicam que a cobertura celular e o alinhamento de fibroblastos aumentaram 40% em matrizes de nanotubos de titânio (Smith et al. 2011). A adesão celular é um fator dependente da topografia, a arquitetura dos nanotubos confere uma área de contato maior, com múltiplos pontos para ancoragem de moléculas de adesão celular.

Associado a esses resultados, o fator da forma foi investigado pela relação largura / comprimento celular. Houve um elongamento significativo das células nos substratos tratados a 630 °C, quando comparada aos demais tratamentos. Estes dados indicam que a estrutura cristalina modificada em nanotubos tratados a 630 °C pode estimular ainda mais os pontos de ancoramento dos fibroblastos com as superfícies, o que pode ser evidenciado pela análise por MEV que mostrou que os nanotubos estimularam o prolongamento dos filopódios e proporcionaram uma melhor interação com o substrato.

Os fibroblastos desempenham um papel importante na produção de proteínas que compõem a matriz extracelular (MEC). O fenótipo, ligação celular, alinhamento e disseminação, são fatores importantes antes da diferenciação celular e, consequentemente, síntese da MEC. Além disso, a interação célula-material e célulacélula são condições para o desenvolvimento e remodelamento da MEC (Chou et al. 1995; Den Braber et al. 1998). Os resultados relatados neste estudo indicaram que a modificação na cristalinidade dos nanotubos pode fornecer um modelo favorável para a viabilidade, adesão, elongamento e proliferação de fibroblastos, principalmente em substratos tratados a 530 e 630 °C. Assim, as superfícies contendo nanotubos de TiO₂, na presença de fase anatase / rutilo, têm grande potencial para serem utilizadas como dispositivo para implantes transcutâneos e dentais. Esses dados são reforçados pelos estudos que mostram que os nanotubos com uma mistura de anatase / rutilo tiveram efeito máximo sobre a proliferação, disseminação e mineralização dos pré-osteoblastos (Mazare et al. 2012; Jiaguo Yu, Wang 2010; An et al. 2011).

69

6.3. ESTUDO BIOLÓGICO COM ADSCs

As análises da resposta de ADSCs, realizados em curto período seguiram os mesmos protocolos realizados para Fibroblastos. Para investigar a toxicidade das superfícies contendo nanotubos de titânio frente as ADSCs, a LDH foi medida após 1 dia da cultura inicial. Quando comparadas ao controle Ti, as superfícies contendo nanotubos tiveram liberação similar de LDH. A análise da viabilidade celular, baseada na redução de resazurin para resofurin pelas ADSCs, revelou um aumento do percentual de redução do sal ao longo dos dias. Após 7 dias este aumento foi significativo nas superfícies tratadas a 630°C em comparação com as demais superfícies. Corroborando com nossos achados, Yu et al analisou a viabilidade celular baseada na atividade mitocondrial, e evidenciou crescimento celular acelerado em superfícies contendo as fases cristalinas anatase/rutilo (tratadas a 550 °C) (W. Q. Yu et al. 2010). Em paralelo, a investigação da proliferação e cobertura celular, analisadas por microscopia de fluorescência através da contagem dos núcleos marcados com DAPI e quantificação dos filamentos de actina marcados com Rodamina/Faloidina respectivamente, confirmaram, maior número de células e extensão do citoesqueleto no dia 7 em superfícies tratadas a 530 e 630 °C.

A investigação do elongamento celular (mensurado a partir do fator de forma), indicou que após 1 dia de cultura, o aumento da temperatura resultou em um fator de forma que se aproximou de 0, indicando que a cristalinidade não apenas influencia a adesão e proliferação celular, mas também no elongamento das células. Houve uma diferença significativa entre o fator de forma das células nas superfícies tratadas a 630 °C e controle de Ti, bem como entre a tratadas a 630 e 300 °C. Estudos demonstraram que a presença de nanoestruturas é capaz de estimular a adesão e a organização do citoesqueleto de osteoblastos (Curtis et al. 2004; Price et al. 2004). Associado ao elongamento das células, a análise por MEV revelou a formação de filopódios, mais pronunciados nas superfícies contendo nanotubos, quando comparado ao controle Ti (Figura 26). Os filopódios são protusões ricas em actina que tem um papel importante no contato com a topografia, na migração e interação célula-célula (Albuschies, Vogel 2013).

A fosfatase alcalina (ALP) é produzida por osteoblastos, sendo considerada um marcador primário da mineralização. Sua função é catalisar a hidrólise de monoésteres de fosfato, aumentando a concentração destes íons em vesículas de matriz, que posteriormente serão liberados para o meio extracelular. A nucleação destes íons com íons cálcio são responsáveis pela formação de hidroxiapatita (HAP) e mineralização do osso (Sharma, Pal, Prasad 2014; Florencio-Silva et al. 2015). Observamos que superfícies contendo anatase/rutilo, tratados a 530 e 630 °C estimularam uma secreção de ALP discretamente maior do que os substratos tratados a 300 °C nas duas primeiras semanas. Na terceira semana ocorre uma oscilação na secreção de ALP. Estes resultados refletem a atividade natural de osteoblastos, em que a produção e secreção de ALP é requerida no início do processo de osseointegração, posteriormente essa atividade declina, dando espaço para a expressão de outros genes responsáveis pela produção de proteínas que compõe a camada osteóide (Golub, Boesze-Battaglia 2004). Além disso, foi possível evidenciar que da semana 1 para a semana 3 houve um aumento significativo da produção de ALP nas superfícies contendo nanotubos em comparação com o Ti. Sabe-se que a produção de ALP é maior em superfícies nanoestruturadas, em comparação com as superfícies de Ti (Jemat et al. 2015; Suwandi et al. 2015; An et al. 2011; Ge et al. 2008; Frandsen, Brammer, Jin 2013).

A deposição da camada osteóide, necessária para a mineralização do tecido ósseo, depende da secreção de proteínas colágenas e não colágenas, como osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN) (Boivin and Meunier 2003; Popat et al. 2007). OPN tem a função de auxiliar na primeira etapa da mineralização, por meio da nucleação de cristais, e sua expressão está associada a níveis elevados de íons fosfato (J. Chen et al. 1994; M. D. McKee, Nanci 1996; Marc D. McKee, Pedraza, Kaartinen 2011; Kohri et al. 1993; Beck, Zerler, Moran 2000; N. X. Chen et al. 2002). A produção de osteopontina apresentou discreto aumento nas superfícies tratadas 530 e 630 °C na semana 2 do estudo, na semana 3 houve um aumento significativo em todas as superfícies contendo nanotubos comparadas ao controle Ti. Sabe-se que superfícies contendo nanotubos são capazes de estimular a expressão de genes envolvidos na formação óssea, dentre eles, o responsável pela produção de OPN (Pozio et al. 2012). A osteocalcina (OCN), atua na segunda etapa da mineralização, caracterizada pelo crescimento dos cristais, através do

aprisionamento de Ca²⁺ extracelular (Ottani et al. 2002). Houve um aumento expressivo na semana 3 do estudo, reforçando sua atuação como um marcador tardio da diferenciação celular (Wolf 2010; Stein, Perren, Mosheiff 2004). Este aumento foi ainda mais pronunciado nas superfícies tratadas a 630 °C. Indicando que a modificação na fase cristalina age diretamente na diferenciação celular, estimulando a produção de OCN.

A quantidade e o tamanho dos cristais de hidroxiapatita formados na mineralização do osso, são regulados pela deposição ordenada tanto das proteínas que compõe a camada osteóide quanto dos íons de cálcio e fosfato (Clarke 2008). A análise por MEV indicou a presença de cristais em forma octaédrica e cristais amorfos. Estudo recente demonstrou que superfícies contendo nanotubos de TiO₂ tratados a 530 °C apresentaram o mesmo padrão cristalino verificado em nosso estudo. Adicionalmente, a análise por EDS, após 21 dias de cultura de células osteogênicas, evidenciou a presença dos minerais cálcio e fósforo, sugerindo a presença de hidroxiapatita (Cowden, Dias-Netipanyj, Popat 2019).

A análise quantitativa de cálcio evidenciou aumento significativo na quantidade de cálcio presente nas superfícies contendo nanotubos quando comparado ao controle Ti. Indicando que os nanotubos de TiO₂ favoreceram o processo de mineralização do tecido ósseo. Além disso, na semana 3 houve uma concentração significativamente maior de cálcio nas superfícies tratadas a 630 °C. Indicando que a modificação na fase cristalina também interfere na resposta celular, favorecendo a mineralização do tecido. No geral os estudos apontam divergência de qual fase cristalina é mais favorável para a mineralização do tecido ósseo, com formação de HAP. Alguns estudos apontam que HAP é mais facilmente formada na fase anatase em comparação com rutilo, ou a mistura anatase/rutilo (Uchida et al. 2002; M. D. Roach et al. 2016). Já foi descrito que a mistura de fases anatase/rutilo foi capaz de agir na ativação plaquetária e estimulou a adesão e proliferação de osteoblastos (Zhang et al. 2018; Bai et al. 2011; An et al. 2011). No entanto, a maneira pela qual a mistura de fases anatase/rulilo influencia no comportamento celular, ainda não foi completamente elucidada. Os resultados relatados indicaram que a modificação da fase cristalina de nanotubos de TiO₂, principalmente as

modificações contendo as fases anatase/rutilo favoreceram a adesão, proliferação e elongamento de ADSCs, adicionalmente, a diferenciação osteogênica foi beneficiada nas estruturas contendo nanotubos, com maior intensidade nas superfícies contendo as fases anatase/rutilo, evidenciando o potencial destas modificações no desenvolvimento de implantes dentários e ortopédicos.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo confirmamos que os parâmetros utilizados para o preparo das superfícies permitiram a variação da estrutura cristalina sem alterar a morfologia dos nanotubos. Os substratos contendo a fase anatase/rutilo favoreceram significativamente a adesão e proliferação de fibroblastos e ADSCs. Além disso, a produção de proteínas que atuam na osseointegração foi mais evidente em nanotubos contendo a mistura de fases anatase/rutilo. Por fim, foi possível concluir que o tratamento do substrato a 630°C permitiu uma mineralização significativamente maior, quando comparado com o titânio comercialmente puro sem modificações e nanotubos tratados a menores temperaturas. Concluímos ainda, que as modificações realizadas nos substratos, estimularam positivamente o comportamento celular *in vitro*, permitindo a adesão e proliferação de fibroblastos e ADSCs, bem como a diferenciação osteogênica, favorecendo a mineralização. Estes dados impulsionam estudos futuros, com a utilização de modelos *in vivo*, para se melhor compreender a ação da mistura de fases anatase/rutilo em nanotubos de TiO₂.

8. REFERÊNCIAS

- Africa, South, Executive Summary, The National Science, Jessica Viola, Bhavya Lal, and Oren Grad. 2003. "The Emergence of Tissue Engineering as a Research Contract #." *Tissue Engineering*.
- Albuschies, J, and V Vogel. 2013. "The Role of Filopodia in the Recognition of Nanotopographies." *Scientific Reports* 3 (1658).
- Aldabergenova, S. B., A. Ghicov, S. Albu, J. M. Macak, and P. Schmuki. 2008. "Smooth Titania Nanotubes: Self-Organization and Stabilization of Anatase Phase." *Journal* of Non-Crystalline Solids 354 (19–25): 2190–94. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2007.10.037.
- American Society of Testing and Materials. 2005. "ASTM Standard." Standard Specification for Wrought Titanium-6 Aluminum-7 Niobium Alloy for Surgical Implant Applications, ASTM International, West Conshohocken [ASTM International Website]. http://www.astm.org.
- An, Sang-Hyun, Ramaswamy Narayanan, Takuya Matsumoto, Hyo-Jin Lee, Tae-Yub Kwon, and Kyo-Han Kim. 2011. "Crystallinity of Anodic TiO2 Nanotubes and Bioactivity." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 11 (6): 4910–18. doi:10.1166/jnn.2011.4114.
- Bai, Yu, II Song Park, Hyeoung Ho Park, Min Ho Lee, Tae Sung Bae, Warwick Duncan, and Michael Swain. 2011. "The Effect of Annealing Temperatures on Surface Properties, Hydroxyapatite Growth and Cell Behaviors of TiO2 Nanotubes." Surface and Interface Analysis 43 (6): 998–1005. doi:10.1002/sia.3683.
- Bavykin, D. V., and F. C. Walsh. 2009. "Titanate and Titania Nanotubes: Synthesis." In *The Royal Society of Chemistry*, 20–49.
- Beck, G. R., B. Zerler, and E. Moran. 2000. "Phosphate Is a Specific Signal for Induction of Osteopontin Gene Expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (15): 8352–57. doi:10.1073/pnas.140021997.
- Bjursten, Lars M., Lars Rasmusson, Seunghan Oh, Garrett C. Smith, Karla S. Brammer, and Sungho Jin. 2010. "Titanium Dioxide Nanotubes Enhance Bone Bonding in Vivo." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 92 (3): 1218–24. doi:10.1002/jbm.a.32463.
- Boivin, G, and P J Meunier. 2003. "Methodological Considerations in Measurement of Bone Mineral Content." *Osteoporos Int* 14: 22–17.
- Braber, E. T. Den, J. E. De Ruijter, L. A. Ginsel, A. F. Von Recum, and J. A. Jansen. 1998. "Orientation of ECM Protein Deposition, Fibroblast Cytoskeleton, and Attachment Complex Components on Silicone Microgrooved Surfaces." *Journal of Biomedical Materials Research* 40 (2): 291–300. doi:10.1002/(SICI)1097-

4636(199805)40:2<291::AID-JBM14>3.0.CO;2-P.

- Brammer, Karla S., Seunghan Oh, Christine J. Cobb, Lars M. Bjursten, Henri van der Heyde, and Sungho Jin. 2009. "Improved Bone-Forming Functionality on Diameter-Controlled TiO2 Nanotube Surface." Acta Biomaterialia 5 (8). Acta Materialia Inc.: 3215–23. doi:10.1016/j.actbio.2009.05.008.
- Buckwalter, A, MJ Glimcher, RR Cooper, and R Recker. 1996. "Bone Biology. I: Structure, Blood Supply, Cells, Matrix, and Mineralization." *Instructional Course Lectures* 45: 371–86.
- Chan, Francis Ka-Ming, Kenta Moriwaki, and Maria Jose Rosa. 2013. "Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity." *Methods Mol Biol* 979: 8–12. doi:10.1007/978-1-62703-290-2.
- Chan, Kh, S Zhuo, and M Ni. 2013. "Natural and Synthetic Peptide-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering." *OA Tissue Engineering* 1 (1): 1–5. doi:10.13172/2052-9643-1-1-787.
- Chen, J., M. D. McKee, A. Nanci, and J. Sodek. 1994. "Bone Sialoprotein mRNA Expression and Ultrastructural Localization in Fetal Porcine Calvarial Bone: Comparisons with Osteopontin." *The Histochemical Journal* 26 (1): 67–78. doi:10.1007/BF00209251.
- Chen, N X, K D O'Neill, D Duan, and S M Moe. 2002. "Phosphorus and Uremic Serum up-Regulate Osteopontin Expression in Vascular Smooth Muscle Cells." *Kidney Int.* 62 (0085–2538 (Print)): 1724–31. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00625.x.
- Cheng, Yan, Hui Yang, Yun Yang, Jianying Huang, Ke Wu, Zhong Chen, Xiaoqin Wang, Changjian Linb, and Yuekun Lai. 2018. "Progress in TiO2 Nanotube Coatings for Biomedical Applications: A Review." *Journal of Materials Chemistry B.* doi:10.1039/x0xx00000x.
- Chou, L S, J D Firth, V J Uitto, and D M Brunette. 1995. "Substratum Surface-Topography Alters Cell-Shape and Regulates Fibronectin Messenger-Rna Level, Messenger-Rna Stability, Secretion and Assembly in Human Fibroblasts." *Journal of Cell Science* 108: 1563–73.
- Clarke, Bart. 2008. "Normal Bone Anatomy and Physiology." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology:* CJASN 3 Suppl 3: 131–39. doi:10.2215/CJN.04151206.
- Cowden, Kari, MF Dias-Netipanyj, and KC Popat. 2019. "Effects of Titania Nanotube Surfaces on Osteogenic Differenciation of Human Adipose-Derived Stem Cells." *Nanomedicine:Nanotechnology, Biology and Medicine* 16: 1–39.
- Curtis, A. S.G., N. Gadegaard, M. J. Dalby, M. O. Riehle, C. D.W. Wilkinson, and G. Aitchison. 2004. "Cells React to Nanoscale Order and Symmetry in Their

Surroundings." *IEEE Transactions on Nanobioscience* 3 (1): 61–65. doi:10.1109/TNB.2004.824276.

Dee, Kay C, David A Puleo, and Rena Bizios. 2002. "An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions Protein-Surface Interactions." *Blood Cells* 4: 37–52. doi:10.1002/0471270598.

Diebold, U. 2003. The Surface Science of Titanium Dioxide.

- Downey, PA, and MI Siegel. 2006. "Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis." *Physical Therapy* 86 (1): 7–91.
- Drouet, Christophe, Anne Leriche, Stuart Hampshire, Mitra Kashani, Artemis Stamboulis, Michele Iafisco, and Anna Tampieri. 2017. *Types of Ceramics: Material Class. Advances in Ceramic Biomaterials: Materials, Devices and Challenges: First Edition.* Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-08-100881-2.00002-6.
- Edalat, F. 2012. "NIH Public Access" 40 (6): 1301–15. doi:10.1007/s10439-011-0452-9.Engineering.
- Florencio-Silva, Rinaldo, Gisela Rodrigues Da Silva Sasso, Estela Sasso-Cerri, Manuel Jesus Simões, and Paulo Sérgio Cerri. 2015. "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells." *BioMed Research International* 2015. doi:10.1155/2015/421746.
- Frandsen, Christine J., Karla S. Brammer, and Sungho Jin. 2013. "Variations to the Nanotube Surface for Bone Regeneration." *International Journal of Biomaterials* 2013. doi:10.1155/2013/513680.
- Galstyan, V., E. Comini, C. Baratto, M. Ferroni, N. Poli, G. Faglia, E. Bontempi, M. Brisotto, and G. Sberveglieri. 2014. "Two-Phase Titania Nanotubes for Gas Sensing." *Procedia Engineering* 87. Elsevier B.V.: 176–79. doi:10.1016/j.proeng.2014.11.612.
- Galstyan, V., A. Vomiero, E. Comini, G. Faglia, and G. Sberveglieri. 2011. "TiO2 Nanotubular and Nanoporous Arrays by Electrochemical Anodization on Different Substrates." *RSC Advances* 1 (6): 1038. doi:10.1039/c1ra00077b.
- Ge, Ruixia, Wuyou Fu, Haibin Yang, Yanyan Zhang, Wenyan Zhao, Zhanlian Liu, Chunjie Wang, Hongyang Zhu, Qingjiang Yu, and Guangtian Zou. 2008. "Fabrication and Characterization of Highly-Ordered Titania Nanotubes via Electrochemical Anodization." *Materials Letters* 62 (17–18): 2688–91. doi:10.1016/j.matlet.2008.01.015.
- Geetha, M., A. K. Singh, R. Asokamani, and A. K. Gogia. 2009a. "Ti Based Biomaterials, the Ultimate Choice for Orthopaedic Implants - A Review." *Progress in Materials Science* 54 (3): 397–425. doi:10.1016/j.pmatsci.2008.06.004.

——. 2009b. "Ti Based Biomaterials, the Ultimate Choice for Orthopaedic Implants - A

Review." *Progress in Materials Science* 54 (3). Elsevier Ltd: 397–425. doi:10.1016/j.pmatsci.2008.06.004.

- Geetha, Manivasagam, Dhinasekaran Durgalakshmi, and Rajamanickan Asokamani. 2010. "Biomedical Implants: Corrosion and Its Prevention - A Review." *Recent Patents on Corrosion Science* 2 (1): 40–54. doi:10.2174/1877610801002010040.
- GK, Hunter. 2013. "Role of Osteopontin in Modulation of Hydroxyapatite Formation."
- Golub, Ellis E, and K Boesze-Battaglia. 2004. "The Role of Alkaline Phosphatase in Osteogenesis." *Journal of Experimental Medicine* 93 (5): 415–26. doi:10.1084/jem.93.5.415.
- Gong, D, A Grimes, C, O K Varghese, W Hu, R S Singh, and Z Chen. 2001. "Titanium Oxide Nanotube Arrays Prepared by Anodic Oxidation." *J Mater Res* 16: 3331–34.
- Grafenau, P B, and O M Lepage. 2000. "Osteocalcin: A Biochemical Marker of Bone Formation in Equine Medicine." *Vet Med (Czech)* 45: 209–16.
- Guéhennec, L. Le, A. Soueidan, P. Layrolle, and Y. Amouriq. 2007. "Surface Treatments of Titanium Dental Implants for Rapid Osseointegration." *Dental Materials* 23 (7): 844–54. doi:10.1016/j.dental.2006.06.025.
- Habraken, W. J.E.M., J. G.C. Wolke, and J. A. Jansen. 2007. "Ceramic Composites as Matrices and Scaffolds for Drug Delivery in Tissue Engineering." *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (4–5): 234–48. doi:10.1016/j.addr.2007.03.011.
- Hamlekhan, Azhang, Arman Butt, Sweetu Patel, Dmitry Royhman, Christos Takoudis, Cortino Sukotjo, Judy Yuan, et al. 2014. "Fabrication of Anti-Aging TiO2 Nanotubes on Biomedical Ti Alloys." *PLoS ONE* 9 (5): 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0096213.
- Hanawa, T., K. Asami, and K. Asaoka. 1998. "Repassivation of Titanium and Surface Oxide Film Regeneration in Simulated Bioliquid." *J Biomed Mater Res1* 40: 530–38. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19980615)40:4<530::AID-JBM3>3.0.CO;2-.
- Heath, D. E, S. L Cooper, B. D Ratner, A. S Hoffman, F. J Schoen, and J. E Lemons. 2013. "Polymers: Basic Principles." In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.*, Academic P.
- Hildebrand, Hartmut F. 2013. "Biomaterials a History of 7000 Years." *BioNanoMaterials* 14 (3–4): 119–33. doi:10.1515/bnm-2013-0014.
- Holzapfel, Boris Michael, Johannes Christian Reichert, Jan Thorsten Schantz, Uwe Gbureck, Lars Rackwitz, Ulrich Nöth, Franz Jakob, Maximilian Rudert, Jürgen Groll, and Dietmar Werner Hutmacher. 2013. "How Smart Do Biomaterials Need to Be? A Translational Science and Clinical Point of View." *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (4). Elsevier B.V.: 581–603. doi:10.1016/j.addr.2012.07.009.

- Hussein, Mohamed A., Abdul Samad Mohammed, and Naser Al-Aqeeli. 2015. "Wear Characteristics of Metallic Biomaterials: A Review." *Materials* 8 (5): 2749–68. doi:10.3390/ma8052749.
- Indira, K., S. Ningshen, U. Kamachi Mudali, and N. Rajendran. 2012. "Effect of Anodization Parameters on the Structural Morphology of Titanium in Fluoride Containing Electrolytes." *Materials Characterization* 71. Elsevier Inc.: 58–65. doi:10.1016/j.matchar.2012.06.005.
- Jemat, A., M. J. Ghazali, M. Razali, and Y. Otsuka. 2015. "Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants." *BioMed Research International* 2015. doi:10.1155/2015/791725.
- Kamitakahara, Masanobu, Chikara Ohtsuki, and Toshiki Miyazaki. 2008. "Review Paper: Behavior of Ceramic Biomaterials Derived from Tricalcium Phosphate in Physiological Condition." *Journal of Biomaterials Applications* 23 (3): 197–212. doi:10.1177/0885328208096798.
- Katchburian, E, and V Arana. 2004. *Histologia E Embriologia Oral*. Edited by Guanabara Koogan.
- Kiradzhiyska, D. D., Y. N. Feodorova, M. M. Draganov, Ch A. Girginov, A. P. Viraneva, T. A. Yovcheva, and R. D. Mantcheva. 2016. "Influence of Surface Treatment on the Biocompatibility of Aluminum Substrates Promising for Medical Application." *AIP Conference Proceedings* 1722: 1–5. doi:10.1063/1.4944307.
- Kohri, K, S Nomura, Y Kitamura, T Nagata, K Yoshioka, M Iguchi, Takanori Yamate, T Umekawa, Y Suzuki, and H Sinohara. 1993. "Structure and Expression of the mRNA Encoding Urinary Stone Protein (Osteopontin)." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (20): 15180–84. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8325891.
- Koparde, Vishal N., and Peter T. Cummings. 2008. "Phase Transformations during Sintering of Titania Nanoparticles." *ACS Nano* 2 (8): 1620–24. doi:10.1021/nn800092m.
- Korzeniewski, Carol, and Denis M. Callewaert. 1983. "An Enzyme-Release Assay for Natural Cytotoxicity." *Journal of Immunological Methods* 64 (3): 313–20. doi:10.1016/0022-1759(83)90438-6.
- Kremers, HM, DR Larson, CS Crowson, and WK Kremers. 2015. "Prevalence of Total Hip and Knee Replacement in the United States." *J. Bone Joint Surg.* 97: 1386–97.
- Kulkarni, Mukta, Anca Mazare, Patrik Schmuki, and Aleš Iglič. 2014. "Biomaterial Surface Modification Of Titanium and Titanium Alloys for Medical Applications," no. November: 111–36.
- Kurtz, Steven. 2007. "Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States from 2005 to 2030." *The Journal of Bone and Joint Surgery*

(American) 89 (4): 780. doi:10.2106/JBJS.F.00222.

- Li, S., V.C. Duance, and E.J. Blain. 2007. "F-Actin Cytoskeletal Organization in Intervertebral Disc Health and Disease." *Biochemical Society Transactions* 35 (4): 683–85. doi:10.1042/BST0350683.
- Liu, Yan, and Xiaogang Zhang. 2009. "Effect of Calcination Temperature on the Morphology and Electrochemical Properties of Co3O4 for Lithium-Ion Battery." *Electrochimica Acta* 54 (17): 4180–85. doi:10.1016/j.electacta.2009.02.060.
- Macák, Jan M., Hiroaki Tsuchiya, and Patrik Schmuki. 2005. "High-Aspect-Ratio TiO2 Nanotubes by Anodization of Titanium." *Angewandte Chemie - International Edition* 44 (14): 2100–2102. doi:10.1002/anie.200462459.
- Mavrogenis, A. F., R. Dimitriou, J. Parvizi, and George C. Babis. 2009. "Biology of Implant Osseointegration." *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions* 9 (2): 61–71. doi:10.1016/j.joms.2007.05.013.
- Mazare, A., M. Dilea, D. Ionita, I. Titorencu, V. Trusca, and E. Vasile. 2012. "Changing Bioperformance of TiO 2 Amorphous Nanotubes as an Effect of Inducing Crystallinity." *Bioelectrochemistry* 87. Elsevier B.V.: 124–31. doi:10.1016/j.bioelechem.2012.01.002.
- McKee, M. D., and A. Nanci. 1996. "Osteopontin at Mineralized Tissue Interfaces in Bone, Teeth, and Osseointegrated Implants: Ultrastructural Distribution and Implications for Mineralized Tissue Formation, Turnover, and Repair." *Microscopy Research and Technique* 33 (2): 141–64. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19960201)33:2<141::AID-JEMT5>3.0.CO;2-W.
- McKee, Marc D., Claudio E. Pedraza, and Mari T. Kaartinen. 2011. "Osteopontin and Wound Healing in Bone." *Cells Tissues Organs* 194 (2–4): 313–19. doi:10.1159/000324244.
- Mohan, L., C. Anandan, and N. Rajendran. 2015. "Electrochemical Behavior and Effect of Heat Treatment on Morphology, Crystalline Structure of Self-Organized TiO2 Nanotube Arrays on Ti–6Al–7Nb for Biomedical Applications." *Materials Science and Engineering C* 50. Elsevier B.V.: 394–401. doi:10.1016/j.msec.2015.02.013.
- Niinomi, Mitsuo. 2008. "Mechanical Biocompatibilities of Titanium Alloys for Biomedical Applications." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 1 (1): 30–42. doi:10.1016/j.jmbbm.2007.07.001.
- Oh, Seunghan, Chiara Dario, Li-Han Chen, Thomas R Pisanic, Rita R, and Sungho Jin. 2005. "Significantly Accelerated Osteoblast Cell Growth on Aligned TiO2 Nanotubes." *Wiley InterScience*. doi:10.1002/jbm.a.30722.
- Oliveira, João Augusto Guedes, Maria Cristina Rosifini Alves Rezende, Cristiane Mayumi Wada, Maria Raquel A N E Lopes, Letícia Cabrera Capalbo, Vanessa Mosca

Gonçalves, and Amanda Dal Bosco Valente. 2015. "O Papel Da Adsorção de Proteínas Na Osseointegração" 4: 18–25.

- Ottani, V D, M Martini, A M R Franchi, and M Raspanti. 2002. "Hierarchical Structures in Fibrillar Collagens." *Micron* 33: 587–96.
- Park, Jung, Sebastian Bauer, Klaus Von Der Mark, and Patrik Schmuki. 2007. "Nanosize and Vitality: TiO2 Nanotube Diameter Directs Cell Fate." *Nano Letters* 7 (6): 1686– 91. doi:10.1021/nl070678d.
- Paulina, Z, Anna Bratek-Skicki, Zbigniew Adamczyk, Paulina Żeliszewska, Anna Bratek-Skicki, Zbigniew Adamczyk, and Michał Cieśla. 2014. "Human Fibrinogen Adsorption on Positively Charged Latex Particles - Langmuir (ACS Publications)." *Langmuir* 30 (37): 11165–11174. doi:10.1021/la5025668.
- Pires, Ana Luiza R., Andréa C K Bierhalz, and Ângela M Moraes. 2015. "Biomaterials: Types, Applications, and Market." *Química Nova* 38 (7): 957–71. doi:10.5935/0100-4042.20150094.
- Popat, Ketul C., Lara Leoni, Craig A. Grimes, and Tejal A. Desai. 2007. "Influence of Engineered Titania Nanotubular Surfaces on Bone Cells." *Biomaterials* 28 (21): 3188–97. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.03.020.
- Pozio, Alfonso, Annalisa Palmieri, Amba Girardi, Francesca Cura, and Francesco Carinci. 2012. "No TitleTitanium Nanotubes Activate Genes Related to Bone Formation in Vitro." *Dental Research Journal* 9: 164–68.
- Price, Rachel L, Karen Ellison, Karen M Haberstroh, and Thomas J Webster. 2004. "Nanometer Surface Roughness Increases Select Osteoblast Adhesion on Carbon Nanofiber Compacts." *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 70 (1): 129– 38. doi:10.1002/jbm.a.30073.
- Puckett, S D, E Taylor, T Raimondo, and T J Webster. 2010. "The Relationship between the Nanostructure of Titanium Surfaces and Bacterial Attachment." *Biomaterials* 31 (4): 706–13.
- Puelo, DA. 2004. *Bone Implant Interface.* Edited by Marcel Dekker. Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering.
- Rani, Sanju, Somnath C. Roy, Maggie Paulose, Oomman K. Varghese, Gopal K. Mor, Sanghoon Kim, Sorachon Yoriya, Thomas J. LaTempa, and C. A. Grimes. 2010.
 "Synthesis and Applications of Electrochemically Self-Assembled Titania Nanotube Arrays." *Physical Chemistry Chemical Physics* 12 (12): 2780. doi:10.1039/b924125f.
- Rath, N C, G R Huff, W E Huff, and J M Balog. 2000. "Factors Regulating Bone Maturity and Strength in Poultry." *Poult Sci* 79: 1024–32.

Ratner, Buddy D, Allan S Hoffman, and Jack E Lemons. 2006. "Biomaterials Science : An

Introduction to Materials in Volume I: Basic Concepts 3 Rd Annual Microscopy Workshop in MICROSCOPY for MATERIALS These Topics Will Be Covered :" 31 (January): 25–27.

- Regonini, D., A. Jaroenworaluck, R. Stevens, and C. R. Bowen. 2010. "Effect of Heat Treatment on the Properties and Structure of TiO2 Nanotubes: Phase Composition and Chemical Composition." *Surface and Interface Analysis* 42 (3): 139–44. doi:10.1002/sia.3183.
- Roach, M D, R S Williamson, I P Blakely, and L M Didier. 2016. "Tuning Anatase and Rutile Phase Ratios and Nanoscale Surface Features by Anodization Processing onto Titanium Substrate Surfaces." *Materials Science & Engineering C* 58. Elsevier B.V.: 213–23. doi:10.1016/j.msec.2015.08.028.
- Roach, Paul, David Farrar, and Carole C. Perry. 2005. "Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes." *Journal of the American Chemical Society* 127 (22): 8168–73. doi:10.1021/ja0428980.
- Sanz, Jesús, Javier Soria, Isabel Sobrados, Sedat Yurdakal, and Vincenzo Augugliaro. 2012. "Influence of Amorphous TiO2-Xon Titania Nanoparticle Growth and Anataseto-Rutile Transformation." *Journal of Physical Chemistry C* 116 (8): 5110–15. doi:10.1021/jp2112044.
- Seo, Hye Yeon, Jae Sung Kwon, Yu Ri Choi, Kwang Mahn Kim, Eun Ha Choi, and Kyoung Nam Kim. 2014. "Cellular Attachment and Differentiation on Titania Nanotubes Exposed to Air- or Nitrogen-Based Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma." *PLoS ONE* 9 (11): 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0113477.
- Shah, Furqan A., Margarita Trobos, Peter Thomsen, and Anders Palmquist. 2016.
 "Commercially Pure Titanium (Cp-Ti) versus Titanium Alloy (Ti6Al4V) Materials as Bone Anchored Implants - Is One Truly Better than the Other?" *Materials Science and Engineering C* 62. Elsevier B.V.: 960–66. doi:10.1016/j.msec.2016.01.032.
- Sharma, Ujjawal, Deeksha Pal, and Rajendra Prasad. 2014. "Alkaline Phosphatase: An Overview." *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 29 (3): 269–78. doi:10.1007/s12291-013-0408-y.
- Smith, Barbara S., Sorachon Yoriya, Thomas Johnson, and Ketul C. Popat. 2011. "Dermal Fibroblast and Epidermal Keratinocyte Functionality on Titania Nanotube Arrays." *Acta Biomaterialia* 7 (6). Acta Materialia Inc.: 2686–96. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.014.
- Soares, Paulo, Marcela Ferreira Dias-Netipanyj, Selene Elifio-Esposito, Victoria Leszczak, and Ketul Popat. 2018. "Effects of Calcium and Phosphorus Incorporation on the Properties and Bioactivity of TiO2 Nanotubes." *Journal of Biomaterials Applications* 33 (3): 410–21. doi:10.1177/0885328218797549.

Song, Ran, Jianhe Liang, Longxiang Lin, and Yanmei Zhang. 2016. "A Facile

Construction of Gradient Micro-Patterned OCP Coatings on Medical Titanium for High Throughput Evaluation of Biocompatibility †." *Journal of Materials Chemistry B* 4. Royal Society of Chemistry: 4017–24. doi:10.1039/C6TB00458J.

- Stein, G S, and J Bowen T A Lian. 1990. "Relationship of Cell Growth to the Regulation of Tissue-Specific Gene Expression during Osteoblast Differentiation." *FASEB J* 4: 3111–23.
- Stein, H, S M Perren, and R Mosheiff. 2004. "New Insights into the Biology of Osteocalcin Meredith." *Orthopedics* 27 (9): 915–18. doi:10.1016/j.bone.2015.05.046.New.
- Sul, Young Taeg, Carina B. Johansson, Yongsoo Jeong, and Tomas Albrektsson. 2001. "The Electrochemical Oxide Growth Behaviour on Titanium in Acid and Alkaline Electrolytes." *Medical Engineering and Physics* 23 (5): 329–46. doi:10.1016/S1350-4533(01)00050-9.
- Suwandi, Jessica S., René E.M. Toes, Tatjana Nikolic, and Bart O. Roep. 2015. "Inducing Tissue Specific Tolerance in Autoimmune Disease with Tolerogenic Dendritic Cells." *Clinical and Experimental Rheumatology* 33: 97–103. doi:10.1002/jbm.a.
- Tian, Huayu, Zhaohui Tang, Xiuli Zhuang, Xuesi Chen, and Xiabin Jing. 2012. "Biodegradable Synthetic Polymers: Preparation, Functionalization and Biomedical Application." *Progress in Polymer Science (Oxford)* 37 (2). Elsevier Ltd: 237–80. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004.
- Toppets, V, V Pastoret, V De Behr, N Antoine, C Dessy, and A Gabriel. 2004. "Morphologie, Croissance et Remaniement Du Tissu Osseux." *Ann. Méd. Vét* 148: 1–13.
- Uchida, Masaki, Hyun-min Kim, Tadashi Kokubo, Shunsuke Fujibayashi, and Takashi Nakamura. 2002. "Structural Dependence of Apatite Formation on Titania Gels."
- Varghese, Oomman K., Dawei Gong, Maggie Paulose, Craig a. Grimes, and Elizabeth C. Dickey. 2003. "Crystallization and High-Temperature Structural Stability of Titanium Oxide Nanotube Arrays." *Journal of Materials Research* 18 (1): 156–65. doi:10.1557/JMR.2003.0022.
- Wang, Guifang, Jinhua Li, Kaige Lv, Wenjie Zhang, Xun Ding, Guangzheng Yang, Xuanyong Liu, and Xinquan Jiang. 2016. "Surface Thermal Oxidation on Titanium Implants to Enhance Osteogenic Activity and in Vivo Osseointegration." *Scientific Reports* 6 (March). Nature Publishing Group: 1–13. doi:10.1038/srep31769.
- Wang, Kathy. 1996. "The Use of Titanium for Medical Applications in the USA." *Materials Science and Engineering A* 213 (1–2): 134–37. doi:10.1016/0921-5093(96)10243-4.
- Wang, Min. 2003. "Developing Bioactive Composite Materials for Tissue Replacement." *Biomaterials* 24 (13): 2133–51. doi:10.1016/S0142-9612(03)00037-1.

- Williams, David F. 2008. "On the Mechanisms of Biocompatibility." *Biomaterials* 29 (20): 2941–53. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- Wilson, Cameron J., Richard E. Clegg, David I. Leavesley, and Mark J. Pearcy. 2005. "Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review." *Tissue Engineering* 11 (1–2): 1–18. doi:10.1089/ten.2005.11.1.
- Wolf, George. 2010. "Function of the Bone Protein Osteocalcin: Definitive Evidence." *Nutrition Reviews* 54 (10): 332–33. doi:10.1111/j.1753-4887.1996.tb03798.x.
- Yang, B., C. K. Ng, M. K. Fung, C. C. Ling, A. B. Djurišić, and S. Fung. 2011. "Annealing Study of Titanium Oxide Nanotube Arrays." *Materials Chemistry and Physics* 130 (3): 1227–31. doi:10.1016/j.matchemphys.2011.08.063.
- Yang, Weihu, Xingfeng Xi, Xinkun Shen, Peng Liu, Yan Hu, and Kaiyong Cai. 2014. "Titania Nanotubes Dimensions-Dependent Protein Adsorption and Its Effect on the Growth of Osteoblasts." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 102 (10): 3598–3608. doi:10.1002/jbm.a.35021.
- Yu, J, Z J Zhao, and L X Li. 1993. "CORROSION FATIGUE RESISTANCES OF SURGICAL IMPLANT STAINLESS STEELS AND TITANIUM ALLOY THE PREMATURE Failure of Orthopaedic Metallic Implants due to Corrosion Fatigue (CF) Has Long Been Recognized 1-8 since Human Body Fluid Acts like Warm, Aerated Sea W" 35.
- Yu, Jiaguo, and Bo Wang. 2010. "Effect of Calcination Temperature on Morphology and Photoelectrochemical Properties of Anodized Titanium Dioxide Nanotube Arrays." *Applied Catalysis B: Environmental* 94 (3–4): 295–302. doi:10.1016/j.apcatb.2009.12.003.
- Yu, W. Q., Y. L. Zhang, X. Q. Jiang, and F. Q. Zhang. 2010. "In Vitro Behavior of MC3T3-E1 Preosteoblast with Different Annealing Temperature Titania Nanotubes." *Oral Diseases* 16 (7): 624–30. doi:10.1111/j.1601-0825.2009.01643.x.
- Zhang, Lu, Xuhui Liao, Alex Fok, Chengyun Ning, Piklam Ng, and Yan Wang. 2018. "Effect of Crystalline Phase Changes in Titania (TiO2) Nanotube Coatings on Platelet Adhesion and Activation." *Materials Science and Engineering C* 82 (March 2017). Elsevier: 91–101. doi:10.1016/j.msec.2017.08.024.

APÊNDICE A – FINANCIAMENTOS E COLABORAÇÕES DESTA PESQUISA

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

Contou ainda com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) – Financiamento de Projeto No. 420588/2013- 2 e Financiamento de Bolsa de Doutorado Sanduíche No. 207274/2015-0.

Além do apoio financeiro, esta pesquisa contou com colaboração das seguintes instituições:

Laboratório Experimental Multiusuário (LEM) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Curitiba, PR – Brasil.

Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Curitiba, PR – Brasil.

Laboratório de Engenharia Mecânica e Escola de Engenharia Biomédica da Colorado State University – Colorado – EUA.

APÊNDICE B – ARTIGO CO-AUTORIA (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)



Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine Available online 11 February 2019



Effects of titania nanotube surfaces on osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells

In Press, Uncorrected Proof (?)

Kari Cowden MS ª, Marcela Ferreira Dias-Netipanyj PhD ^{a, b}, Ketul C. Popat PhD ^{a, c} 옷 ⊠

Show more

https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.01.008

Get rights and content

Abstract

The surface of an implant is important for successful osseointegration and long-term stability as it can aid in cell migration and proliferation, cell differentiation and allow extracellular matrix production. Earlier studies have shown that nanostructuring the surface of titanium can enhance mesenchymal stem cell (MSC) migration, proliferation, and differentiation. Although many studies have evaluated MSC response on nanostructured surfaces, there are only a few studies that have explored the response of adipose-derived stem cells (ADSC) on titania nanotube surfaces. Because ADSC exhibit great potential in regenerative medicine and have already proven effective in developing new treatments, this study aims to further understand how ADSC interact with titania nanotube surfaces. The results of this study indicate that titania nanotube surfaces enhance ADSC proliferation and differentiation that is also dependent on the size of nanotubes. Additionally, the favorable response of ADSC on nanotube surfaces suggests a potential application in orthopedic tissue regeneration.

APÊNDICE C – ARTIGO CO-AUTORIA

6

Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering, 2018, 6, 6-14

Bioactivity and Antibacterial Effects of Ag-Ca-P Doped PEO Titania Coatings

Luciane S. Santos¹, Dhanna Francisco¹, Evelyn Leite², Sheron Cogo^{3,4}, Marcela Dias-Netipanyj^{3,4}, Shelon Pinto², Selene Espósito³, Ketul Popat⁴ and Paulo Soares^{1,*}

¹Department of Mechanical Engineering, Polytechnic School, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba – PR 80215-901 Brazil

²Dentistry Department, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa - PR, 84010-290 Brazil

³Health Science Department, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba – PR 80215-901 Brazil

⁴Department of Mechanical Engineering, School of Biomedical Engineering, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523 USA

Abstract: Implant centered infections remain as one of the main complications associated with the use of biomedical implants. These infections can be avoided with the development of bactericidal coatings that prevent bacterial contamination since the very early stage of implantation. However, a multifunctional coating should inhibit bacterial contamination without generating cytotoxic responses. To achieve this purpose, this work presents a comparative evaluation of coatings with different concentrations of Ag. Coatings containing silver, calcium and phosphorous were obtained by plasma electrolytic oxidation (PEO) and its bactericidal activity and cytotoxicity were evaluated against Staphylococcus aureus and adipose derived stem cells (ADSC), respectively. Silver, calcium and phosphorous were successfully incorporated in the coatings and silver has not affected the coating morphology nor the crystalline structure. ADSC viability was unaltered by cell growth over the surfaces, despite the observation of thinner cells on coatings with higher silver content. After 24 h of incubation, bactericidal activity was observed in coatings with more than 0.6 % at. Ag incorporated, while coatings with 0.2 % at. Ag presented an increased bacterial proliferation indicating a hormetic response. Thus, Ag-CaP-TiO2 coating could be a potential solution for the prevention of implant infections.

1. INTRODUCTION

Metallic implants are prone to bacterial contamination during and after surgery, leading to implant centered infections (ICI) [1-3]. The current ICI treatment of ICI consists of long antibiotic therapies and revision surgeries, representing a clinical challenge and an economic burden for health care systems [4-6]. Despite the efforts to avoid the bacterial contamination, the ICI still has high rates of occurrence and mortality [7–9].

The use of bactericidal coatings on metallic implants represent a long term alternative to avoid bacterial contamination [10]. Many researchers have suggested the use of silver based coatings, as this element presents a broad spectrum bactericidal activity [11-14]. The bactericidal mechanism of silver is not fully understood yet, but it is well known that silver ions can interact with thiol groups (S-H) forming Ag-S bonds. Thiol groups are present in many proteins and its disruptions lead to loss of proteins shape and functionality [15,16]. Silver also kills bacteria by generating reactive oxygen species (ROS) which impairs enzymes from the respiratory chain and prevents DNA replication [17]. Silver is used as a bactericidal agent in air disinfection systems, water filters and food package, but the use of silver in indwelling devices remain controversial as some cytotoxic reactions can be originated [18-23]. Studies in vitro showed that silver nanoparticles decrease liver cells viability by ROS generation, inducing cells to apoptosis [24,25]. A case study conducted by Trop et al. [26], had also showed the increase of silver levels in blood and a higher production of liver enzymes when silver based wound dressings were used for burn healing. Furthermore, the indiscriminate use of silver can induce argyria, a cutaneous manifestation where silver precipitates are deposited on the skin, giving it a brownish-grey appearance [27-29]. As the use of bactericidal coatings in endosseous implants must not damage eukaryotic cells around the implant, and silver has a dose-dependent cytotoxicity, a systematic investigation of the proper amount of silver in implants is needed in order not to impair osseointegration [30,31].

An effective technique to incorporate elements on the surface of titanium implants is the plasma

^{*}Address correspondence to this author at the Pontificia Universidade Católica do Paraná, Department of Mechanical Engineering, Rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho, Curitiba, PR – 80710-230, Brazil; Tel: +55 (41) 3271-1338; E-mail: pa.soares@puepr.br

APÊNDICE D – ARTIGO CO-AUTORIA

Check for updates

Hard Tissues and Materials

Effects of calcium and phosphorus incorporation on the properties and bioactivity of TiO₂ nanotubes

Paulo Soares¹, Marcela Ferreira Dias-Netipanyj¹, Selene Elifio-Esposito¹, Victoria Leszczak² and Ketul Popat²

Abstract

In this study, we investigate the formation of calcium and phosphorus-doped TiO_2 nanotubes, produced by potentiostatic anodization of Ti in viscous electrolyte-containing HF and Ca/P ions. Characterization of the produced oxide layer was conducted using scanning electron microscopy, glancing-angle X-ray diffraction, X-ray photoelectron spectroscopy, contact angle, and protein adsorption measurements. Adipose-derived stem cells were used to study material cytotoxicity, cell viability and proliferation, and cell morphology and growth. To evaluate the adipose-derived stem-cell differentiation, we investigated the expression of osteocalcin and osteopontin by cells as well as calcium mineralization. Results show that it was possible to produce a superhydrophilic titanium oxide nanotube layer with incorporation of Ca and P ions. The presence of Ca and P in the oxide layer not only improved the cell adhesion and

proliferation but also stimulated the production of key marker proteins indicating differentiation of cells.

Keywords

TiO₂, nanotubes, adipose-derived stem cells, protein adsorption, bioactivity, Ca and P

Introduction

Titanium implants exhibit excellent biocompatibility in comparison to other metal implants due to the presence of an amorphous TiO2 layer, which forms spontaneously when in contact with the atmosphere.¹ This oxide layer can also be artificially grown to improve its surface properties by a variety of methods, for example, heating, acid etching, alkali treatment, and electrolytic oxidation also known as anodizing.2-4 Such properties, for instance, crystalline structure, composition, roughness, thickness, and morphology of the oxide layer have a significant effect on new bone formation around the titanium implants and are critical for its clinical success.5-7 Chemical composition and topography are known to be the most important implant surface properties, affecting the protein adsorption, and, consequently, the biological reactions, which is why it is extensively studied to optimize oral and orthopedic implants.8-12

According to Le Guéhennec et al.,¹³ an ideal titanium implant should have modifications in surface roughness at the nanoscale level for promoting protein adsorption and cell adhesion and

biomimetic calcium phosphate coatings for enhancing osteoconduction.

The surface topography modification at nanoscale has a fundamental role in regulating cell behavior and improving osseointegration.¹⁴ Results presented by Shalabi et al.¹⁵ indicate that micron or sub-micron rough surfaces enhance osteoblast proliferation, adhesion, alkaline phosphatase, and mineralization when compared with non-modified titanium surfaces. These rough topographies are believed to provide geometrically favorable surfaces, which provide mechanical interlocking with cells at the micron dimension. Popat et al.¹⁶ showed that nanotubular titania surfaces have a 40% increase in the number of cells compared to flat titania surfaces. Oh et al.¹⁷ explored the effects of

¹Pontificia Universidade Catolica do Parana, Curitiba, Paraná, Brazil ²Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA

Corresponding author:

biomaterials applications

Journal of Biomaterials Applications 2018, Vol. 33(3) 410-421 © The Author(s) 2018 Article reuse guidelines: sagepub.com/journals-permissions DOI: 10.1177/085230218797549 journals.sagepub.com/home/jba

Paulo Soares, Pontificia Universidade Catolica do Parana, Rua Imaculada Conceicao 1155, Polytechnic School, Curitiba, Paraná 80215-901, Brazil. Email: pa.soares@pucpr.br

APÊNDICE E – ARTIGO CO-AUTORIA



Full Length Article

Bioactive and antibacterial boron doped TiO₂ coating obtained by PEO L. Sopchenski^a, S. Cogo^b, M.F. Dias-Ntipanyj^b, S. Elifio-Espósito^b, K.C. Popat^c, P. Soares^{a,*}



^a Department of Mechanical Engineering, Polytechnic School, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brazil

^b Health Science Department, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brazil

^c Department of Mechanical Engineering, School of Biomedical Engineering, Colorado State University, United States

A R T I C L E I N F O

ABSTRACT

Keywords: Titanium Plasma electrolytic oxidation Boron TiO₂ Bioactivity Antibacterial

Eradication of implant centered infection remains a clinical challenge as the biofilm formation protects the bacteria. Bactericidal surfaces represent an effective tool in the prevention of biofilm formation, although the bactericidal agent cannot be cytotoxic to assure a proper implant osseointegration. Boron is a trace element, beneficial to bone formation and bactericidal against several strains. In this research, a boron containing coating was obtained on a titanium surface by plasma electrolytic oxidation. Its bioactivity and bactericidal activity were evaluated and compared to a boron-free coating. Boron presence has not changed the morphology, roughness and crystalline structure of the coating. Adipose derived stem cells culture revealed the coating biocompatibility and its bactericidal activity was assessed against *Staphylococus aureus* and *Pseudomonas aerugnosa*. This study revealed for the first time the bactericidal activity of a biocompatible boron doped TiO₂ coating.

1. Introduction

Endosseous titanium implants are susceptible to bacterial contamination during and after the operative process, leading to an inflammatory process in surrounding tissues [1,2]. Most of implant centered infections are caused by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, a commensal inhabitant of human skin [3,4]. Bacteria attached to the implant surface forms a structured cell community enveloped by a self-produced polymeric matrix, called biofilm [5]. The biofilm provides nutrients, control gene regulation and protects the bacteria from the external environment [6]. Biofilm compromises the soft tissue healing and bone apposition by inhibiting the attachment and growth of eukaryotic cells. As the bacteria inside the biofilm is protected from the host defense and oral antibiotic therapies, in most cases the implant failures and the removal is the only effective treatment [7,8]. A promising approach to avoid biofilm formation from the very early stage is the use of bactericidal surfaces [9].

Bactericidal surfaces can prevent bacteria attachment and proliferation based on antibiotic delivery or in the presence of some bactericidal agent (as nitric oxide, bactericidal elements, or nanoparticles) [10,11]. The prophylactic use of antibiotic could have some disadvantages, as the kinetic of elution, with a high release rate within the first hours, the possible ineffective concentration and the exposure of health patients to the drug [12–15]. Surfaces doped with bactericidal elements (as silver, copper, and zinc) are being developed in order to overcome the antibiotic delivery limitations [16-19]. Those elements can be immobilized on the implant surface under the ionic or nanoparticulate form by distinct mechanisms. Shuilin et al. showed the bactericidal activity of coatings made of Ag nanoparticles (NP) and ZnO NP incorporated into hydroxyapatite powder and deposit it on titanium implants by laser cladding [20]. NP can also be incorporated into titanium nanotubes and sealed with coordination polymers, witch release the bactericidal NP upon a change in the environment acidity caused by the bacterial infection [21]. Metallic silver can also be incorporated on TiO2 composite nanofibers by electrospinning technique, granting bactericidal activity against Escherichia coli. Silver, copper and zinc and have bactericidal activity, although there is a concerning about their cytotoxicity on eukaryotic cells, for this reason some researches propose the concomitant use of those elements with collagen or chitosan to reduce cytotoxicity [22-25]. As an effective bactericidal surface could not present cytotoxicity, is valuable the investigation of others bactericidal agents.

Boron is a trace element used for a long time as food preservative and recently its compounds has been investigated as a pharmaceutical agent [26,27]. Boron compounds have bactericidal activity and antibiofilm properties against gram-positive and gram-negative bacteria, and antifungal activity [28–30]. The bactericidal mechanism of action is not fully understood yet, but it is believed to have a non-specific

https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.07.049

Available online 10 July 2018

^{*} Corresponding author at: Pontificia Universidade Católica do Paraná, Polytechnic School, Department of Mechanical Engineering, Rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho, Curitiba, PR 80710-230, Brazil. *E-mail address:* pa.soares@pucp.br (P. Scares).

Received 27 April 2018; Received in revised form 5 July 2018; Accepted 9 July 2018

APÊNDICE F – ARTIGO CO-AUTORIA

Applied Surface Science 455 (2018) 780-788



Full Length Article

Incorporation of silver nanoparticles on Ti7.5Mo alloy surface containing TiO₂ nanotubes arrays for promoting antibacterial coating – In vitro and in vivo study



Ana Paula Rosifini Alves Claro^{a,*}, Reginaldo T. Konatu^a, Ana Lúcia do Amaral Escada^a, Miriam Celi de Souza Nunes^b, Cláudia Vianna Maurer-Morelli^b, Marcela Ferreira Dias-Netipanyj^c, Ketul C. Popat^c, Diego Mantovani^d

^a UNESP-São Paulo State University, School of Engineering, Materials and Technology Department, Guaratinguetá, SP, Brazil ^b UNICAMP – University of Campinas, Faculty of Medical Sciences, Department of Medical Genetics, Campinas, São Paulo, Brazil ^c Colorado State University, Department of Mechanical Engineering/School of Biomedical Engineering, Fort Collins, CO, USA

^d Laval University, Metallurgy and Materials Engineering, Department of Mining, Québec City, Quebec, Canada

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Keywords: Nanotubes Titanium allovs Antibacterial activity Silver nanoparticles

Bulk and surface properties are very important for materials used in biomedical applications. The development of new surface treatments, such as antibacterial coatings can directly affect the response of the surface. The purpose of this study was the development of antibacterial coating on the Ti7.5Mo alloy surface combining TiO2 nanotubes with silver nanoparticles incorporation using polydopamine assisted immobilization technique. Surface characterization analysis showed that silver nanoparticles were successfully immobilized. The concentration established was bactericidal, i.e., no bacteria grew after incubation. In vivo results showed that silver incorporation on the surface containing TiO2 nanotubes did not cause altered locomotor activity in zebrafish. On the other hand, it affected the cell adhesion on the surface. Thus, these results confirm the hypothesis that silver nanoparticles were totally incorporated to polydopamine on the surface containing TiO2 nanotubes and acted as the main mechanism the death of the bacteria by contact.

1. Introduction

The major challenge in the development of materials for biomedical applications is to obtain a material with excellent bulk and surface properties. When a biomaterial is inserted into human body it must exhibit a good interaction with the tissue with favorable response. The surface properties such as chemical composition, surface energy and topography are essential for success of implant and favorable host response. However, several studies have shown that bacterial infections on biomaterial is a major problem that may lead to failure of the implant.

Surface roughness is beneficial for osseointegration and bone anchorage for orthopedic implants [1-4]; however, it may induce bacterial adhesion on the implant surface. Adhered bacteria may form biofilm that acts as a medium for supplying nutrients to the bacteria inside the dense biofilm [5,6]. Recent studies related to modifying surface topography showed it improved the cellular adhesion and some instances reduce bacterial adhesion [7] compare to techniques using antibacterial nanoparticles incorporation on the surface [8-10].

Antimicrobial agents can be incorporated on the surface of a biomaterial using polymeric coatings. Mussel inspired polydopamine (PDA) was found to produce thin films coating with several functional uses. Catechol and amino groups are present in PDA and exhibit metal binding ability. They could combine strongly with various metal ions, such as silver and copper, by chelation, through dip-coating in silver nitrate or chloride solutions, respectively (haeshin). The production of antibacterial coating using a polydopamine film for metal ions immobilization have been studied by Saidin et al. [11]. The functionalization of the stainless steel surface through a multi-step process of dopamine polymerization, Ag metallization and HA biomineralization was evaluated. The SS316L substrates were first pre-treated and grafted with polydopamine through a self-polymerization technique. The Ag nanoparticles were then metallized on the polydopamine film, followed by the formation of second layer polydopamine film. HA biomineralization was performed in 1.5 Simulated Body Fluid (SBF) solution. The antibacterial activity of the coating was investigated on Escherichia

E-mail address: rosifini@feg.unesp.br (A.P.R. Alves Claro).

* Corresponding author.

https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.05.189 Received 12 December 2017; Received in revised form 19 May 2018; Accepted 24 May 2018 Available online 31 May 2018 0169-4332/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

APÊNDICE G – ARTIGO CO-AUTORIA



Materials Science and Engineering: C

Volume 75, 1 June 2017, Pages 1305-1316



In-vitro cell adhesion and proliferation of adipose derived stem cell on hydroxyapatite composite surfaces

Praneetha Pulyala ^{a, b, 1}, Akshay Singh ^{a, b, 1}, Marcela Ferreira Dias-Netipanyj ^{b, c}, Sheron Compos Cogo ^{b, d}, Luciane S. Santos ^e, Paulo Soares ^e, Vasanth Gopal ^f, V. Suganthan ^f, Geetha Manivasagam ^f, Ketul C. Popat ^b $\stackrel{\otimes}{\sim}$ 🖾

Show more

https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.175

Get rights and content

Abstract

The goal of this work was to enhance the mechanical strength and fracture toughness of brittle hydroxyapatite (HAP) by reinforcing it with nanocomposites such as graphene oxide (GO), carbon nanotubes (CNT) and Titania. The goal was also to evaluate the cytotoxicity and the cellular adhesion/proliferation of these composites. The composites were characterized for their crystallinity, functionality, morphology and mechanical properties. Altering the composition by adding 1 wt% GO and CNT significantly altered the wettability, hardness and roughness. Further, X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FITR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) results confirm the crystal structure, bulk chemical composition and surface elemental composition respectively of the composites. The bulk hardness of HAP with CNT was significantly higher than that of HAP. The wettability of HAP with GO was significantly lower than that of HAP with GO and Titania. Adipose Derived Stem Cells (ADSCs) were used for this study to evaluate cytotoxicity and viability. HAP with CNT and HAP with CNT and Titania were found to be least cytotoxic compared to other composites as evaluated by Lactate Dehydrogenase (LDH) assay and alamarBlue assay. ADSC adhesion and proliferation was investigated after 1, 4 and 7 days of culture using fluorescence microscopy. All the composites nurtured ADSC adhesion and proliferation, however, distinct morphological changes were observed by using Scanning Electron Microscopy (SEM). Overall, these composites have the potential to be used as bone graft substitutes.

APÊNCICE H - ARTIGOS SUBMETIDOS/EM REVISÃO

Submetido para publicação a revista *Materials Science & Engineering – C* (ISSN: 0928-4931) em outubro de 2017, e intitula-se: *Effect of crystalline phases of titania nanotube arrays on adipose derived stem cell adhesion and proliferation.*

Fwd: Invitation to revise manuscript MSEC_2017_4319

Ref: MSEC_2017_4319 Title: Effect of crystalline phases of titania nanotube arrays on adipose derived stem cell adhesion and proliferation Journal: Materials Science & Engineering C

Dear Professor Soares,

Thank you for submitting your manuscript to Materials Science & Engineering C. We have completed the review of your manuscript. A summary is appended below. While revising the paper please consider the reviewers' comments carefully. We look forward to receiving your detailed response and your revised manuscript.

To submit your revised manuscript:

- Log into EVISE⊚ at: <u>http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=MSEC</u>
- · Locate your manuscript under the header 'My Submissions that need Revisions' on your 'My Author Tasks' view
- Click on 'Agree to Revise'
- Make the required edits
- Click on 'Complete Submission' to approve

What happens next?

After approving your submission you will receive a notification that the submission is complete. To track the status of your paper throughout the editorial process, log into EVISE® at: <u>http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?</u> JRNL ACR=MSEC

Enrich your article to present your research with maximum impact. This journal supports the following Content Innovations:

A ser submetido a revista *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (ISSN: 0957-4530), intitulado: *Effect of crystalline phases of titania nanotube arrays on fibroblast viability, adhesion and proliferation.*

A ser submetido a revista *Material Science & Engineering C: Materials for Biological Applications* (ISSN: 0928-4931), intitulado: *Effect of crystalline phases of titania nanotube arrays on differentiation of Adipose Derived Stem Cells – ADSCs.*

APÊNDICE I- PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS INTERNACIONAIS COM APRESENTAÇÃO ORAL

XXVI INTERNATIONAL MATERIALS RESEARCH CONGRESS 2017 (CANCÚN-MÉXICO)

DIAS-NETIPANYJ, MARCELA FERREIRA; ESPOSITO, S. E.; SOARES, PAULO; POPAT, KETUL C. Heat treatment effect on the differentiation of adipose derived stem cells on TiO₂ nanotubes. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

XVI BRAZIL MRS MEETING – BRAZILIAN MATERIALS RESEARCH SOCIETY – SBPMat 2017 (GRAMADO-BRASIL)

DIAS-NETIPANYJ, MARCELA FERREIRA; ESPOSITO, S. E.; POPAT, KETUL C.; SOARES, PAULO. Heat treatment effects on fibroblast functionality of TiO₂ nanotubes. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE INTERNATIONAL SOCIETY 2016 (SAN DIEGO-USA)

DIAS-NETIPANYJ, M.F.; Nascimento, T.G.F.C.; COGO, S. C.; ESPOSITO, S. E.; P. SOARES; Popat, K.C. Effect of annealing temperature of titania nanotube arrays on Adipose Derived Stem Cell functionality. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

APÊNDICE J - ORIENTAÇÕES REALIZADAS

INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Gustavo Diego Carloto. Efeito do tratamento térmico da camada de nanotubos de TiO₂ na viabilidade, adesão e proliferação de osteoblastos. Início: 2017. Iniciação científica (Graduação em Biotecnologia) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO

Sheron Campos Cogo. Avaliação da viabilidade e proliferação de células troncomesenquimais derivadas de tecido adiposo em superfícies nanoestruturadas de TiO₂. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

ESTÁGIO CURRICULAR EM CULTIVO CELULAR

Franciele de Fátima Telles Mathias. Estágio Curricular em Cultivo Celular. 2015. (Graduação Ciências Biológicas) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Alana Lourenço Matoso de Deus. Estágio Curricular em Cultivo Celular. 2015. (Graduação Ciências Biológicas) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.