

**UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**A INTERAÇÃO DOS OSTEOCLASTOS PRIMÁRIOS HUMANOS COM
AS SUPERFÍCIES DE IMPLANTES DENTÁRIOS DE ÓXIDO DE
TITÂNIO BIOATIVO INCORPORADAS COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ESTRÔNCIO**

DISSERTAÇÃO

NATHÁLIA FORMOSO DA CUNHA

2022

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

A INTERAÇÃO DOS OSTEOCLASTOS PRIMÁRIO HUMANOS COM
AS SUPERFÍCIES DE IMPLANTES DENTÁRIOS DE ÓXIDO DE
TITÂNIO BIOATIVO INCORPORADAS COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ESTRÔNCIO

NATHÁLIA FORMOSO DA CUNHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Implantodontia).

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Sara Gemini Piperni

Co-orientadoras:

Prof^a. Dr^a. Esther Rieko Takamori

Prof^a. Dr^a. Danielle Dutra Voigt

A INTERAÇÃO DOS OSTEÓCLASTOS PRIMÁRIOS HUMANOS COM
AS SUPERFÍCIES DE IMPLANTES DENTÁRIOS DE ÓXIDO DE
TITÂNIO BIOATIVO INCORPORADAS COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ESTRÔNCIO

NATHÁLIA FORMOSO DA CUNHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, da Universidade
do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte
dos requisitos para a obtenção do grau de
Mestre em Odontologia (Área de
Concentração: Implantodontia)

Aprovada em de setembro de 2022

Banca examinadora

Prof. Dr. Plínio Senna
Universidade UNIGRANRIO

Prof. Victor Talarico Leal Vieira
Universidade UNIGRANRIO

Prof^a. Dr^a. Carina da Silva Boghossian
Universidade Federal do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo apoio espiritual que me concedeu nesse momento, só Ele e eu sabemos o quanto foi difícil realizar essa dissertação, quantos momentos eu pensei em desistir de tudo, mas a minha fé me sustentou. Deus agradeço por ser meu horizonte, por me ajudar a passar pelas adversidades.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Sara Gemini Piperni: seu apoio, orientação, compreensão, paciência, conhecimentos e ideias fizeram desta uma experiência inspiradora para mim, sem ela não teria conseguido. Também gostaria de agradecer à minha co-orientadora Prof^a Dr^a Esther Rieko Takamori, por todo acompanhamento, companheirismo e sabedoria. Aos meus familiares por me apoiar durante todo o período de estudo até a finalização dessa dissertação.

A Unigranrio, ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) e a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), incluindo todos os profissionais envolvidos, por todo auxílio fornecido durante a pesquisa.

EPÍGRAFE

Pedras no caminho? Eu guardo todas. Um dia vou
construir um castelo.

Nemo Nox

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	2
1.1. Modelação, remodelação óssea e osseointegração óssea	2
1.1.1. Osteoclastos	3
1.2. Implante dentário	6
1.3. Oxidação por micro-arco	8
1.4. Estrôncio	11
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. OBJETIVO GERAL	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Preparação de amostras	18
4.2. Caracterização das superfícies	19
4.3. Cultivo celular	19
4.3.1. Cultivo de osteoclastos humanos	19
4.3.2. Microscopia de fluorescência	20
4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Caracterização das superfícies antes e depois da adesão celular	22
5.2. Avaliação da diferenciação de osteoclastos sobre a superfície caracterizada	28
5.3. Interação celular em nanoescala de osteoclastos com a superfície caracterizada	33
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
9. ANEXOS	54

RESUMO

O envelhecimento do perfil social e demográfico aponta para o aumento do uso de implantes e a necessidade de melhorar a osteointegração dos materiais dentários. Para este fim, se destaca a técnica de oxidação por micro arcos (MAO), que permite aumentar a rugosidade da superfície do implante e incorporar novos elementos bioativos para estimular a osteointegração.

Objetivo: o presente estudo tem como objetivo compreender a interação de osteoclastos primários humanos com superfícies de TiO₂ incorporadas por MAO com Cálcio (Ca), Fósforo (P) e três diferentes concentrações de Estrôncio (Sr).

Materiais e Métodos: As superfícies incorporadas com os elementos bioativos foram produzidas pela técnica de MAO e caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada a EDS antes e depois o plaqueamento celular. Monócitos isolados de sangue humano foram plaqueados nas superfícies em presença de citocinas osteoclastogênicas e a adesão e a formação de osteoclastos foi avaliada por microscopia de fluorescência e MEV.

Resultados. As superfícies de titânio incorporadas com elementos bioativos foram produzidas com sucesso pela técnica de MAO. A incorporação dos elementos desejados, assim como a presença de poros foi confirmada pela MEV-EDS. Todas as superfícies apresentaram uma boa adesão celular e a superfície de mmsr mostrou um maior número celular e área superficial ocupada comparada com o controle.

Conclusões. A superfície com uma concentração de estrôncio de 0,013 M apresentou um aumento da área ocupada pelas células e da presença de osteoclastos que corrobora com a presença de uma aumentada estimulação do colágeno pelos osteoblastos, mostrada pelo grupo em um artigo anterior. Sendo o metabolismo ósseo é resultado de um delicado equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, esta superfície se mostra promissora para ser usada em implantes dentários e em outras aplicações em regeneração óssea.

Palavras-chave: Osteoclastogênese, oxidação por micro-arco, estrôncio, implantes dentários

ABSTRACT

The social and demographic aging lead to a progressive increase in the use of implants and the need to improve the osseointegration of dental materials. For this, the micro-arc oxidation (MAO) technique stands out, which making it possible to increase the roughness of the implant surface and incorporate new bioactive elements to stimulate osseointegration.

Objective: The present study aims to understand the interaction of human primary osteoclasts with TiO₂ surfaces incorporated by MAO with Calcium (Ca), Phosphorus (P) and three different concentrations of Strontium (Sr).

Materials and Methods: The surfaces incorporated with the bioactive elements were produced by the MAO technique and characterized by scanning electron microscopy (SEM) coupled to EDS before and after cell plating. Monocytes isolated from human blood were plated on the surfaces in the presence of osteoclastogenic cytokines and the adhesion and formation of osteoclasts was evaluated by fluorescence microscopy and SEM.

Results. Titanium surfaces incorporated with bioactive elements were successfully produced by the MAO technique. The incorporation of the bioactive elements, as well as the presence of pores, was confirmed by SEM-EDS. All surfaces showed good cell adhesion and the mmSr surface showed a higher cell number and surface area occupied, when compared to the control.

Conclusions. The surface with a strontium concentration of 0.013 M showed an increase in the area occupied by cells and in the presence of osteoclasts, which corroborates the presence of an increased stimulation of collagen by osteoblasts, shown by the group in a previous article. Since bone metabolism is the result of a delicate balance between bone formation and resorption, this surface shows promise to be used in dental implants and in other applications in bone regeneration.

Keywords: Osteoclastogenesis, micro-arc oxidation, strontium, dental implants

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágio da remodelação óssea	3
Figura 2. Imagem de imunofluorescência de um osteoclasto em lâmina de vidro	4
Figura 3. Esquema da regulação RANK-L / OPG	5
Figura 4. Processo de oxidação por micro-arco	10
Figura 5. Mecanismo de ação do estrôncio em osteoblastos e osteoclastos	14
Figura 6. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura	23
Figura 7. Caracterização dos elementos bioativos incorporados às superfícies de titânio por MEV-EDS	24
Figura 8 Caracterização semi-quantitativa dos elementos bioativos nas superfícies de titânio (MEV-EDS)	25
Figura 9 Caracterização dos elementos bioativos incorporados às superfícies de titânio por MEV-EDS, após adesão celular	26
Figura 10. Caracterização semi-quantitativa dos elementos bioativos nas superfícies de titânio (MEV-EDS), após adesão celular	27
Figura 11. Adesão celular nas superfícies de titânio incorporadas com elementos bioativos	29
Figura 12 Células TRAcP positivas diferenciadas nas superfícies incorporadas com elementos bioativos	30
Figura 13. Área total ocupada por células após interação com superfícies de titânio incorporadas com os diferentes elementos bioativos	32
Figura 14. Área ocupada por células após interação com superfícies de titânio incorporadas com os diferentes elementos bioativos normalizada por número de células	33
Figura 15. Interação em nanoescala dos osteoclastos com as superfícies incorporadas com diferentes elementos bioativos	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Ag: Prata

ALP: Fosfatase alcalina

BLNK: Proteína ligante de célula B

BMPs: Proteínas morfogenéticas ósseas

BMU: Unidades multicelulares básicas

BSP11: Osteocalcina sialoproteína óssea II (*Bone sialoprotein II*)

BTK: Tirosina quinase de Bruton

Ca: Cálcio

Cl⁻: Íon de cloreto

CMEMS-UMinho: Center of MicroElectroMechanical Systems, University of
Minho, Guimarães, Portugal.

CO₂: Óxido de carbono

CTMs: Células tronco mesenquimais

CtsK: Catepsina K

cFMC: Receptor de macrófago

cFos: Fosforilação

DC-STAMP: Proteína transmembrana específica de célula dendrítica

DMP1: Proteína da matriz dentinária 1

DRX: Difração de Raio X

EDS: Espectroscopia por energia dispersiva de raio X (do inglês *Energy Dispersive Spectroscopy*)

FEG-SEM: *FEI Nova 200 field emission gun scanning electron microscope*

FGF-23: Fatores de crescimento fibroblásticos 23

FTIR: Infravermelho por transformada de *Fourier*

GH: Hormônio Do Crescimento Humano

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

G-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos

H⁺: Íon de hidrogênio

HA: Hidroxiapatita

HANK: Solução de sais balanceada

H₂O: Água

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL: Interleucina

IP-10: Proteína 10 induzida por *Interferon - gama*

ITAM: Tirosina do imunorreceptor

IFN- γ : *Interferon - gama*

MAO: Oxidação por micro-arcos

MCP: Proteína da célula mol

M-CSF: Fator estimulador de colônia de macrófagos

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

Mg: Magnésio

MMP: Metaloproteinase de matriz

MITF: Fator de transcrição de microftalmia

MIP-1 α : Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa

MIP-1 β : Proteína inflamatória de macrófago 1 beta

NFATc1: Fator de transcrição das células T ativadas

OCN: Osteocalcina

OPG: Osteoprotegerina

OSCAR: Receptor associado ao osteoclasto

P: Fósforo

PDGF-BB: Fator de crescimento derivado de plaquetas BB

PEO: Oxidação por plasma eletrolítico

pH: Potencial Hidrogênico

PHEX: Endopeptidase neutra reguladora de fosfato

PIRA: Receptores pareados similares a imunoglobulina do tipo de ativação

PU.1: Fator de transcrição

RANK: Receptor do fator nuclear Kappa- β

RANKL: Ativador do receptor do fator nuclear Kappa- β

RUNX2: Fator de transcrição 2 relacionado ao RUNT

RANTES: Célula T normal expressa e segregada

SIRP β 1: Proteína reguladora beta 1

SYK: Tirosina quinase

SLP: Proteína semelhante a estomatina

TCLE: Termo de livre consentimento e esclarecimento

TEC: Células epiteliais tímicas

Ti: Titânio

TiO₂: Óxido de titânio

TREM2: Receptor desencadeador expresso em células mieloides 2

Ti: Titânio

TiO₂: Óxido de titânio

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

Si: Sílica

SiC: Carbetto de Sílica

Sr: Estrôncio

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

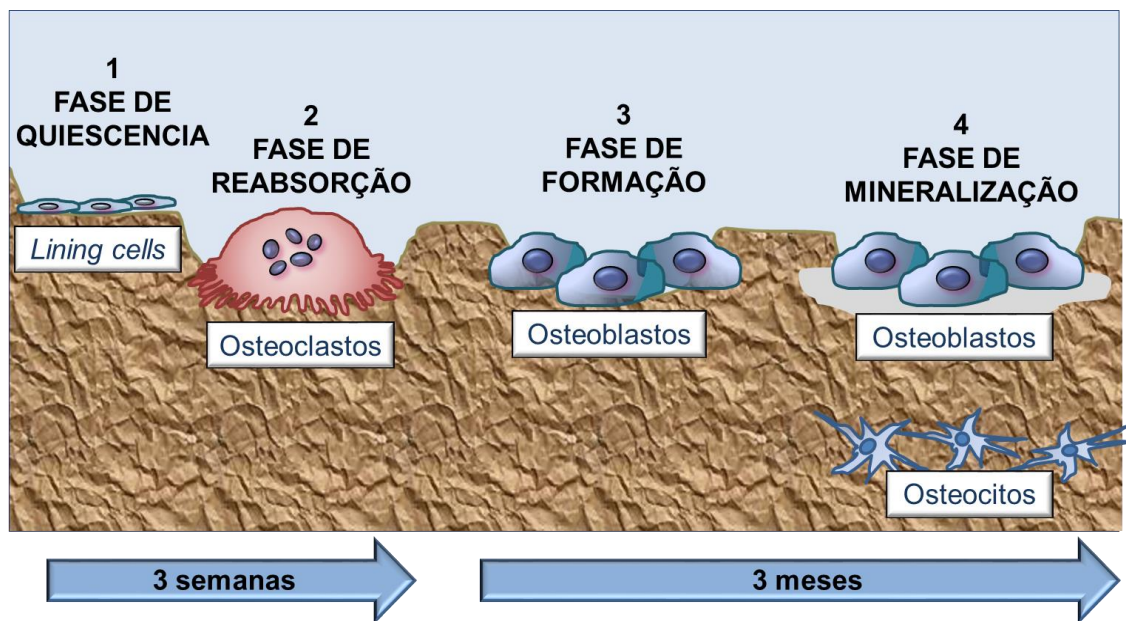
1.1. Modelação, remodelação óssea e osseointegração óssea

A modelação óssea é um processo fisiológico o qual permite o crescimento ósseo, enquanto a remodelação óssea proporciona uma renovação constante. O osso está em um estado permanente de remodelação, o que é importante para manutenção da estrutura e da função de um esqueleto normal. A remodelação óssea é um processo dinâmico que envolve muitos tipos de células e fatores. Os osteoblastos e osteoclastos são as duas principais células ósseas que participam desses processos (CHEN et al., 2016; MATSUO; IRIE, 2008). O osso é o único tecido no corpo de um vertebrado que contém esta célula, os osteoclastos, cuja principal função é reabsorver ativamente o tecido hospedeiro (KARSENTY, 2017). Conforme a figura 1.

A remodelação óssea apresenta-se como um recurso crucial para “osseointegração” (ALBREKTSSON AND WENNERBERG, 2019), definida inicialmente como um contato direto entre implantes e osso no nível de resolução do microscópio óptico (HALLÉ; N et al., 1976). Desde então, a evolução das técnicas de implantes, assim como, os avanços da ciência dos materiais, levaram um aprimoramento desta definição, que hoje define como "osseointegração" como o contato direto com formação de uma união estável e funcional entre o osso e o implante (ALBREKTSSON AND WENNERBERG, 2019). A osseointegração é uma consequência de uma cascata de eventos moleculares e celulares que ocorrem após a preparação de um leito de implante e a colocação de implante dentário. Isso leva a aposição de osso recém-formado diretamente na superfície do implante. O padrão de formação óssea e osseointegração é semelhante ao observado na cicatrização de fraturas ósseas. O comportamento das células da linhagem osteogênica é afetado

pela natureza do material, sua biocompatibilidade e pelas suas propriedades físico-químicas, tanto resistência, dureza (propriedades macroscópicas) quanto pela micro e nano topografia da superfície do implante (PELLEGRINI et al., 2018; Y. LI et al., 2020; SEDELNIKOVA et al., 2019). Isso é devido ao fato que o tecido ósseo é dinâmico e possui uma fisiologia complexa, de fundamental importância funcional e estrutural para a vida humana (KARSENTY, 2017).

Figura 1. Estágios da remodelação óssea:



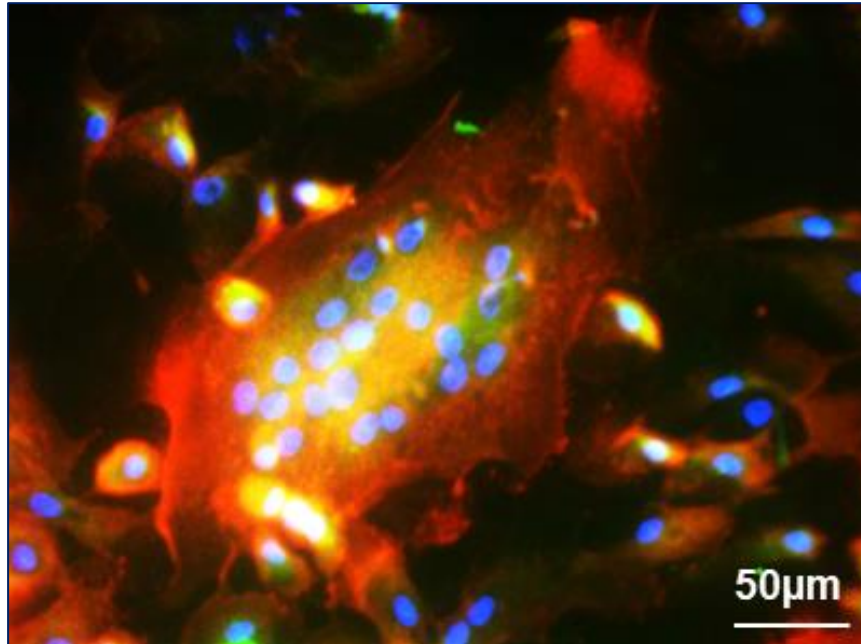
A remodelação óssea é um processo dinâmico, que depende do equilíbrio de duas células principais do osso: os osteoblastos e os osteoclastos. Esse processo ocorre praticamente em 4 estágios: A primeira fase de quiescência onde as lining cells estão dispostas na superfície óssea. Após os estímulos que expõem a superfície óssea, os osteoclastos começam a fase de reabsorção, seguida por uma fase de formação, realizadas pelos osteoblastos, e por uma fase de mineralização, que culmina na formação de osteócitos quando os osteoblastos ficam presos na matriz mineralizada que eles mesmos produzem (Adaptada de SARAN; GEMINI PIPERNI; CHATTERJEE, 2014).

1.1.1. Osteoclastos

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas (Figura 2) e terminalmente diferenciadas que possuem a capacidade de degradar o tecido ósseo

pela secreção de substâncias, como, H^+ , Cl^- , catepsina K (CtsK) e metaloproteinases de matriz (MMPs) na área de reabsorção (OWEN; REILLY, 2018).

Figura 2. Imagem de imunofluorescência de um osteoclasto em uma lâmina de vidro

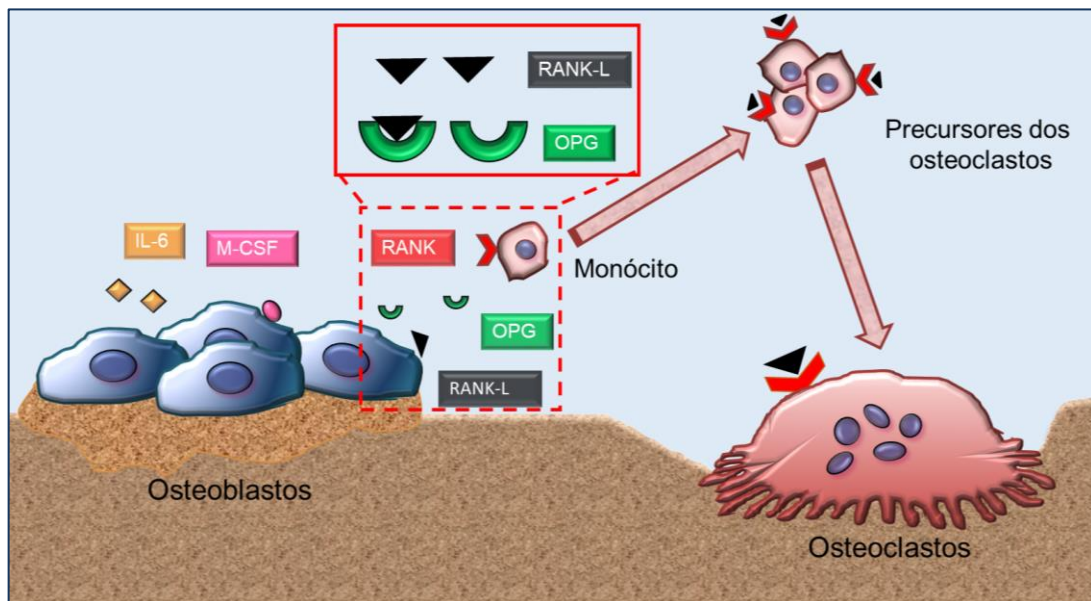


Os osteoclastos são células gigantes com mais 40 micrômetros de diâmetro. Contém de 15 a 20 núcleos estreitamente ovais (Fonte: própria).

Eles se originam de precursores mononucleares da linhagem monócito-macrofágico hematopoéticas, sob a influência de vários fatores. Dentre esses fatores, estão incluídos o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF- *Macrophage Colony Stimulating Factor*), secretado por células mesenquimais osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e células estromais. Os M-CSF se ligam aos receptores (cFMS) que estão presentes nos monócitos, precursores de osteoclastos, estimulando a sua proliferação e inibindo a apoptose celular (TAKAYANAGI, 2007). Outro fator que estimula a formação dos osteoclastos é a citocina *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANK-L), ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B), que, ligando o receptor *Receptor activator of nuclear factor kappa-B* (RANK) presente na

superfície dos monócitos, impulsiona a migração e fusão destas células, para originar osteoclastos (ONO; NAKASHIMA, 2018). O RANK-L é produzido por osteoblastos, osteócitos e células estromais. Por outro lado, outro fator chamado osteoprotegerina (OPG), produzido por uma ampla gama de células, incluindo osteoblastos, células estromais e fibroblastos gengival e periodontal, atua como receptor solúvel do RANK-L. Quando esta molécula se liga ao RANK-L, impede a interação RANK-L/RANK e, conseqüentemente, inibe a osteoclastogênese (Figura 3) (J.; H.; J.E., 2009; OWEN; REILLY, 2018).

Figura 3. Esquema da regulação RANK-L / OPG



O sistema RANK-L / RANK / OPG é um mediador chave da osteoclastogênese. Os osteoblastos produzem RANK-L, uma citocina que se liga ao receptor RANK presente nos monócitos estimulando a fusão destas células para formar osteoclastos maduros. A osteoprotegerina (OPG) produzida sempre pelos osteoblastos é um receptor solúvel do RANK-L, capaz de sequestrá-lo e inibir assim a osteoclastogênese (Autoria Sara Gemini Piperni).

A interação RANK-L / RANK também promove a expressão de outros fatores osteoclastogênicos como NFATc1 e DC-STAMP (MIYAMOTO, 2006). Ao interagir

com os fatores de transcrição PU.1, cFos e MITF, o NFATc1 regula os genes osteoclastos específicos, incluindo TRAP e catepsina K, que são fundamentais para a atividade dos osteoclastos e reabsorção de matriz orgânica. Sob influência da interação RANK-L / RANK, o NFATc1 também induz a expressão de DC-STAMP, que é necessário para a fusão de precursores de osteoclastos. Apesar desses fatores terem sido bem definidos, recentemente foi demonstrado que o potencial osteoclastogênico pode variar dependendo do local ósseo considerado (ONO; NAKASHIMA, 2018). Os osteoclastos da medula óssea longa são formados mais rapidamente do que na mandíbula. É possível que haja uma dinâmica diferente na osteoclastogênese, devido à composição celular da medula óssea específica do local do osso (R. SILVA, G. SASSO, E. SASSO-CERRI, M. SIMÕES, 2015).

1.2. Implante dentário

Na implantodontia, a interação do implante com o tecido ósseo é crucial para reabilitação odontológica através dos implantes dentários. Entre todos os materiais metálicos utilizados em implantes biomédicos, desde 1930, o titânio (Ti) e suas ligas apresentam as melhores propriedades, pois exibem uma melhor compatibilidade biológica, uma excelente resistência à corrosão, uma baixa densidade, um baixo módulo de elasticidade e não são tóxicos (LI et al., 2020b; SEDELNIKOVA et al., 2019). A alta resistência à corrosão e a excelente biocompatibilidade do Ti são essencialmente devido à formação espontânea de uma camada protetora de óxido altamente estável sobre sua superfície, quando exposta ao ar, caracterizado por uma espessura que varia de aproximadamente 1,5 a 10µm (KUROMOTO; SIMÃO; SOARES, 2007). Apesar de todas estas vantagens, sabe-se que o Ti é um material

que possui propriedades tribológicas deficientes que pode estar associada com efeitos biológicos deletérios (YETIM, 2010).

Quando metais, como por exemplo, o titânio, são expostos a um meio corrosivo e, simultaneamente, a uma ação mecânica, um processo de degradação com o nome de tribocorrosão acontece. Este fenômeno leva a uma transformação irreversível do material devido à ação simultânea da corrosão e do desgaste mecânico (adesão, abrasão e fadiga) durante um contato tribológico (LANDOLT; MISCHLER; STEMP, 2001). A degradação do material é resultado de um complexo sinergismo estabelecido entre os processos químicos, eletroquímicos e mecânicos, sendo as interações que ocorrem em um sistema tribocorrosivo de difícil previsão (LANDOLT; MISCHLER; STEMP, 2001; MATHEW et al., 2012).

Este processo de degradação pode resultar na liberação de produtos de corrosão, como íons metálicos e partículas oriundos do desgaste, podendo provocar reações biológicas prejudiciais como a indução de uma resposta inflamatória, envolvendo a presença de macrófagos e, conseqüentemente, reabsorção óssea e futura falha do implante (AZZI; SZPUNAR, 2007).

Quando acontece algum dano ou ruptura da camada de óxido passivo existente sobre as superfícies dos implantes, a taxa de corrosão local pode aumentar (corrosão acelerada pelo desgaste). O ambiente corrosivo pode afetar o mecanismo de formação e as propriedades físicas das partículas destacadas durante o contato tribológico. E dependendo das propriedades dessas partículas, a corrosão pode acelerar ou desacelerar a taxa de remoção mecânica de material do substrato (LANDOLT; MISCHLER; STEMP, 2001). Durante o movimento, os fenômenos de despassivação e repassivação da camada de óxido passivo podem acontecer na

região de contato (LANDOLT; MISCHLER; STEMP, 2001). Sendo assim, a perda de material pode ser provocada por mecanismos mecânicos e eletroquímicos (MATHEW et al., 2010, 2012).

O sucesso a longo prazo dos implantes dentários de Ti depende da estabilidade primária e da osseointegração eficiente (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2019). O processo de osseointegração é fundamentalmente afetado pela topografia e composição química das superfícies dos implantes (BRÅNEMARK et al., 1983). Embora o Ti e suas ligas sejam biocompatíveis, infelizmente, são bioinertes, dessa forma, eles não criam condições para a osseointegração com o tecido ósseo (LEE et al., 2015). A formação óssea insuficiente ao redor do biomaterial após a implantação é também uma das causas mais frequentes de falha dos implantes dentários (SURMENEV; SURMENEVA; IVANOVA, 2014). Com base nisso, vários estudos têm demonstrado que as propriedades de superfície como topografia (rugosidade e porosidade) e composição química desempenham um importante papel em sua resposta biológica para aplicações biomédicas (RIBEIRO et al., 2015). A topografia de superfície pode também influenciar o formato da célula, o que por sua vez, também pode exercer alguma influência em sua proliferação, diferenciação e função celular (OLIVEIRA et al., 2015). Uma ampla variedade de estratégias físicas ou químicas tem sido desenvolvida para a modificação da superfície de titânio, como jateamento de areia, ataque ácido, ataque a laser, pulverização de plasma, revestimento sol-gel e oxidação por micro-arco (LOPES et al., 2018a).

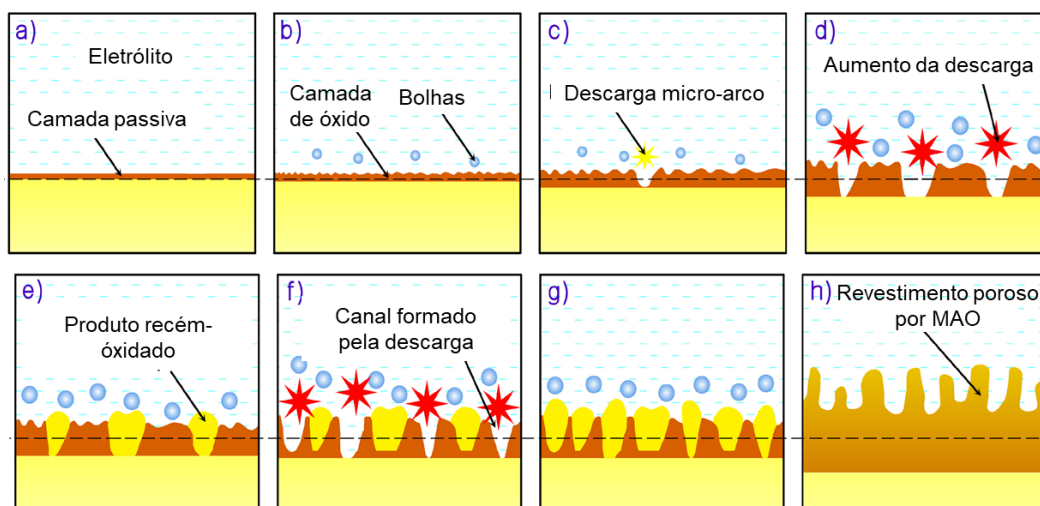
1.3. Oxidação por micro-arco

A oxidação por micro-arco (MAO), também chamada de oxidação por plasma eletrolítico (PEO) atraiu atenção especial, pois é uma técnica eficaz para depositar

revestimentos de óxidos na superfície de metais não ferrosos, modificando a topografia da superfície e conferindo, dependendo do elemento incorporado, uma melhoria das propriedades biológicas. A técnica de MAO é um método simples e rápido, baseado no princípio que o potencial elétrico aplicado induz o crescimento de uma camada de óxido de titânio, responsável pela baixa toxicidade do material, aumentando a resistência ao desgaste e à corrosão dos materiais (KUROMOTO, SIMÃO, AND SOARES, 2007; RIBEIRO ET AL., 2015). Nos pontos fragilizados do óxido superficial (rachaduras, os locais de altas concentrações de tensão), micro-arcs de faíscas elétricas altamente energéticas que quebram a camada superficial do óxido. O óxido é derretido e, em contato com o eletrólito, solidifica-se rapidamente, permitindo que alguns elementos presentes na solução sejam incorporados na nova camada aumentada de óxido (HE X. ET AL., 2017), como demonstrado na figura 4. O tamanho dos poros e o tipo de revestimento criados sobre o material podem variar de acordo com os parâmetros utilizados no processo, como a composição da solução eletrolítica, o tempo de tratamento da superfície, frequência, corrente e ainda com a voltagem empregada no sistema (WALSH et al. 2009). A rugosidade da superfície é assim aumentada proporcionando uma melhor interação com o tecido ósseo e, portanto, aumentando a osteointegração (PELLEGRINI ET AL., 2018). Além disso, esse tratamento permite a incorporação de elementos bioativos durante a conversão de superfície de metal de Ti para o seu óxido, que podem ser cálcio (Ca), fósforo (P), silício (Si) e prata (Ag) (ALVES et al., 2013). Compostos formados por Ca e P (CaP) são conhecidos como bioativos, pois interagem diretamente com o tecido ósseo circundante, devido sua composição elementar ser similar à do osso natural (LAURINDO ET AL., 2014). O aumento da bioatividade da superfície acelera as

reações com o meio biológico e o processo de osseointegração, reduzindo o tempo de cicatrização, forma uma ancoragem mais resistente por meio da obtenção de maior área de contato osso/implante e uma possível união química da superfície com o tecido ósseo (LAURINDO ET AL., 2014).

Figura 4. Processo de oxidação por micro-arco



A camada de óxido (b) é formada inicialmente. Então, sob a ação das faíscas de descarga elétrica (c) que ficam mais fortes (d), o novo revestimento de óxido gerado, (e) formado e engrossado. A formação e a quebra do revestimento de óxido são contínuas (g) formando grandes canais (f). Finalmente, o revestimento poroso de óxido se forma incorporando os elementos eventualmente presentes nos eletrólitos iniciais (h) (Adaptação de HE et al., 2017).

Com isso, MAO tornou-se uma técnica bem conhecida por proporcionar a produção de uma camada de óxido porosa, espessa e bem aderida à superfície do material. O tamanho dos poros e o tipo de revestimento criados sobre o material podem variar de acordo com os parâmetros utilizados no processo, como a composição da solução eletrolítica, o tempo de tratamento da superfície, frequência, corrente e ainda com a voltagem empregada no sistema (WALSH et al. 2009). A rugosidade da superfície é assim aumentada proporcionando uma melhor interação com o tecido ósseo e, portanto, aumentando a osteointegração (PELLEGRINI ET AL., 2018). Além disso, esse tratamento permite a incorporação de elementos bioativos

durante a conversão de superfície de metal de Ti para o seu óxido, que podem ser cálcio (Ca), fósforo (P), silício (Si) e prata (Ag) (ALVES et al., 2013). Compostos formados por Ca e P (CaP) são conhecidos como bioativos, pois interagem diretamente com o tecido ósseo circundante, devido sua composição elementar ser similar à do osso natural (LAURINDO ET AL., 2014). O aumento da bioatividade da superfície acelera as reações com o meio biológico e o processo de osseointegração, reduzindo o tempo de cicatrização, forma uma ancoragem mais resistente por meio da obtenção de maior área de contato osso/implante e uma possível união química da superfície com o tecido ósseo (LAURINDO ET AL., 2014).

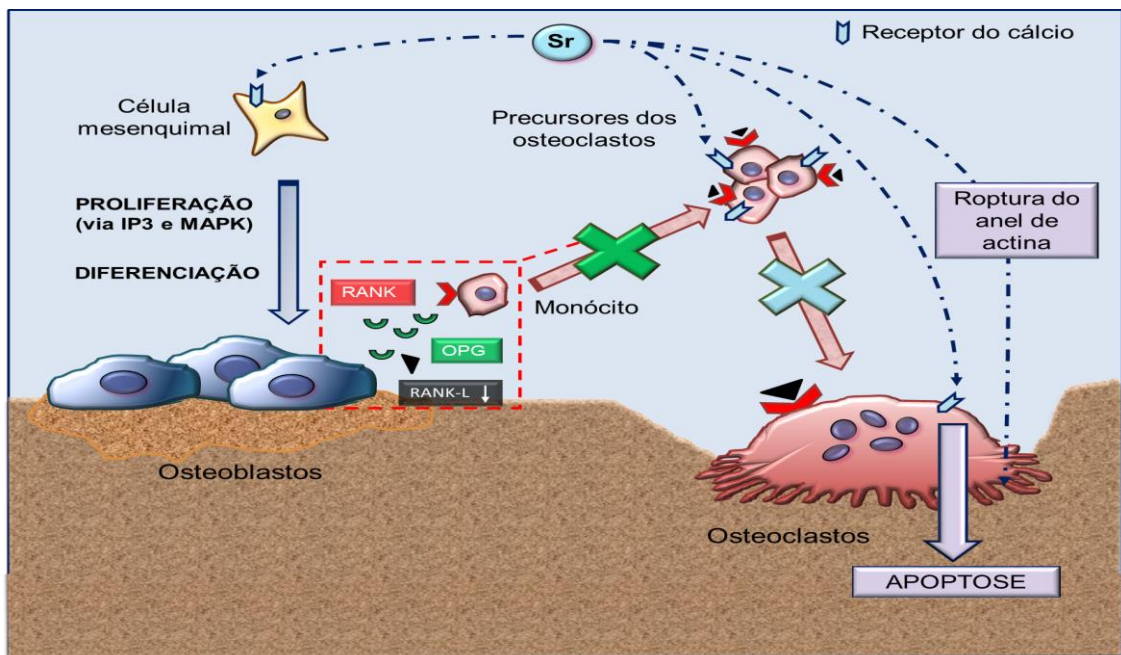
1.4. Estrôncio

O estrôncio (Sr) é um metal alcalino-terroso com afinidade ao osso e, particularmente, a elementos como o cálcio (Ca) aumentando a replicação e diferenciação dos osteoblastos e a mineralização da matriz óssea, por meio de um mecanismo dependente do receptor sensível ao cálcio, presente tanto nos osteoblastos, quanto em precursores de osteoclastos e osteoclastos maduros e que também é indutor do comprometimento das células tronco mesenquimal na linhagem óssea (MARX et al., 2020). Ao mesmo tempo, o Sr pode inibir a reabsorção óssea, reduzindo a produção de metaloproteinase da matriz dos osteoblastos, reduzindo a atividade de diferenciação e reabsorção dos osteoclastos e induzindo a apoptose dos osteoclastos. (MARX et al., 2020). Este íon afeta a comunicação entre osteoblastos e osteoclastos, que desempenham um papel importante no controle da diferenciação dos osteoclastos que envolve diversos mecanismos moleculares. Além de promover a proliferação, sobrevivência e diferenciação dos osteoblastos, estimulando assim a formação de osso, o Sr pode aumentar a expressão osteoblástica de mRNA de OPG

e reduzir a expressão de RANK-L *in vitro* (SATO ET AL., 2016). Desta forma, a razão RANK-L/ OPG (osteoprotegerina, receptor solúvel do RANK-L) é desequilibrada, a favor desta última, que sequestra as poucas moléculas de RANKL impedindo a ligação ao receptor RANK na superfície dos monócitos e resultando assim na inibição da osteoclastogênese. Além disso a ligação do estrôncio no receptor cálcio sensível na superfície dos osteoclastos maduros promove a apoptose dos mesmos e a literatura mostra também interferência do estrôncio com a estrutura da actina que forma a borda estriada, causando um comprometimento da formação da lacuna de reabsorção (AKINTOYE, BOYCE and COLLINS, 2013), esses mecanismos se ilustram na figura 5. A liberação constante de *in situ* Sr se torna então promissora para melhorar a osseointegração na interface implante/osso, tanto que vários estudos recentes investigaram os benefícios da incorporação de Sr nos biomateriais (LI et al., 2018), de forma direta dose dependente, tanto em estudo com animais (MARX et al. 2020) quanto em ensaios clínicos (BOIVIN ET AL., 2008). A incorporação de Sr em revestimentos de implantes de hidroxiapatita (HA) e as superfícies de óxido de Ti obtidas por métodos hidrotérmicos melhoraram significativamente a função dos osteoblastos e promoveram a fixação biomecânica dos implantes (LIU ET AL., 2015). Os íons de Sr expostos no local desejado, melhoram a osteoindução e a osseointegração na interface osso-implante, reduzindo a reabsorção óssea. Dessa forma contribuem para uma cicatrização óssea mais rápida após a implantação. Apesar das controvérsias em torno do Sr, demonstrou-se que os materiais ósseos modificados por Sr tem um desempenho melhor do que quando ausente. (KIM ET AL., 2017). A avaliação de biomateriais enriquecidos com Sr *in vitro* e *in vivo* permite a determinação dos efeitos da liberação local de íons no osso e se isso pode ter um

efeito alternativo em comparação à administração sistêmica. É importante entender como a liberação de Sr interage com essas variáveis para reforçar a interface osso-implante pode ajudar a entender melhor o mecanismo de ação do Sr (MARX et al.,2020). A literatura mostra como o Sr apresenta um efeito dose-dependente na estimulação da osteogênese. Em baixas doses (2-5 ppm), este elemento aumenta a replicação e a diferenciação dos osteoblastos bem como a mineralização da matriz óssea. Ao mesmo tempo, ele pode inibir a reabsorção óssea, reduzindo a produção de metaloproteinase da matriz dos osteoblastos, reduzindo assim a atividade de diferenciação e reabsorção dos osteoclastos e induzindo a apoptose dos osteoclastos. Uma porção na interface da superfície do implante / tecido para melhorar a osseointegração tem apresentado benefícios da carga de Sr nos biomateriais. Uma superfície revestida e uma liberação controlada de Sr a longo prazo podem dar origem a um material com maior capacidade de promover osteogênese e, assim, alcançar osseointegração rígida do implante (DANG ET AL., 2016). Contudo, é importante ressaltar que, altas doses de estrôncio (entre 20-100 ppm) podem inibir a calcificação (SAKAI ET AL., 2012). Neste contexto, as superfícies de titânio com a incorporação de estrôncio devem ser testadas em relação a biocompatibilidade tanto com osteoblastos, para avaliar os efeitos na formação óssea, quanto com os osteoclastos, para avaliar os efeitos na reabsorção, para obter um quadro completo das dinâmicas ósseas envolvidas (MARX et al., 2020).

Figura 5. Mecanismo de ação do estrôncio em osteoblastos e osteoclastos



O estrôncio (Sr) se liga ao receptor sensível ao cálcio das células mesenquimais estimulando proliferação, sobrevivência e diferenciação dos osteoblastos. O Sr age nos osteoclastos de duas formas: indiretamente ele inibe a produção de RANK-L e estimula a da OPG inibindo a osteoclastogênese; diretamente se liga ao receptor sensível ao cálcio presentes nos monócitos inibindo a osteoclastogênese, ao mesmo receptor nos osteoclastos maduros promovendo a apoptose e também interfere com a formação do anel de actina da borda dos osteoclastos, impedindo a reabsorção da matriz óssea (Autoria de Sara Gemini Piperni).

2. JUSTIFICATIVA

O aumento do uso de implantes registrado nas últimas décadas é devido ao aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento ósseo bem como ao aumento de aglomerações de alta densidade urbana, estão expostas, cada dia mais, a lesões traumáticas e à violência cosmopolita de populações jovens. Este cenário impactará nas próximas décadas no custo da saúde no Brasil e no mundo fazendo necessário procurar soluções que reduzam custos e aumentem a eficiência e a qualidade dos implantes gerados para pacientes (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2019).

Com a evolução tecnológica, os implantes dentários e ortopédicos têm sido cada vez mais indicados, sendo um dos principais tratamentos para a reabilitação óssea, melhorando o desempenho para os pacientes. Com isso, o melhoramento da superfície do implante tem sido cada vez mais estudado, para melhorar a interface osso-implante. Colocar no mercado produtos de qualidade e de custo reduzido, tornando o tratamento acessível é o desafio da indústria especializada. O aumento na demanda pela reabilitação oral com implantes também se dá pelo crescimento de especialistas habilitados para realizar tal procedimento. Dentro deste cenário, o aprimoramento de novos materiais capazes de atuar nos sistemas biológicos, em escala molecular, para reparar e regenerar tecido danificado, é um foco da rede de Nano Saúde do Rio de Janeiro, da qual o grupo faz parte desde 2020.

O titânio é o material de escolha padrão-ouro para os implantes, pelas suas propriedades químicas e mecânicas além da sua alta biocompatibilidade. Porém, ele é bioinerte, fazendo com que, em muitos casos, haja formação óssea insuficiente ao redor do implante quando aplicados puro (LI et al., 2020). Baseando-se nessa

informação, estudos na literatura recente são projetados com o objetivo de fornecer técnicas de revestimentos e tratamento dessas superfícies para melhorar a resposta e reação óssea ao longo do tempo. Neste sentido, uma técnica promissora é a oxidação por micro arcos, que aumenta da camada de óxido externa, responsável pela baixa toxicidade deste metal, enquanto permite a incorporação de elementos osteoindutores (como cálcio e fosfato) e um elemento promissor pelas suas propriedades de estimulação de formação óssea e de inibidor da reabsorção é o estrôncio (HE X. et al., 2017). A maioria dos trabalhos relativos aos implantes dentários são principalmente focados na interação do implante com os osteoblastos. Contudo, a manutenção de um tecido ósseo saudável, assim como a correta osteointegração do implante são baseados em um complexo e finamente regulado equilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos.

Nesta linha, o presente estudo pretende compreender a reação de células de osteoclastos primários humanos nas superfícies de Ti tratadas por MAO, e incorporadas com elementos bioativos de cálcio (Ca), fósforo (P) e estrôncio (Sr) em três diferentes concentrações, que já se mostraram promissoras (MARX et al., 2020) na sua interação com os osteoblastos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O atual estudo propôs a avaliar a interação de superfícies de titânio (Ti) porosas incorporadas, utilizando a técnica de MAO, com elementos bioativos de cálcio (Ca), fósforo (P) e três diferentes concentrações de estrôncio (Sr) com osteoclastos humanos tendo como objetivo o aprimoramento de novos materiais capazes de atuar nos sistemas biológicos, em escala molecular, para reparar e regenerar tecido ósseo danificado.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar as superfícies de Ti por oxidação MAO;
- Cultivo de osteoclastos humanos;
- Avaliar a adesão e morfologia celular dos osteoclastos plaqueados em superfícies de Ti porosas incorporada com elementos bioativos de cálcio (Ca), fósforo (P) e estrôncio (Sr).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparação de amostras

As superfícies de titânio foram preparadas e cedidas pelo laboratório de CMEMS-UMinho – Center of MicroElectroMechanical Systems, University of Minho, Guimarães, Portugal.

Placas de Ti (1 x 1 cm) foram lixadas com papéis abrasivos de carbeto de silício (SiC) e em seguida foi realizado o ataque químico pela imersão das amostras em uma solução de reagente de Kroll (1:1 para HF: HNO₃: H₂O), por 10 segundos. Logo depois, as amostras foram limpas em propanol com auxílio de um aparelho de ultrassom por 15 minutos, seguidos por 10 minutos em água destilada e secas com ar quente. Realizado o pré-tratamento da superfície, o tratamento anódico foi executado usando a técnica da oxidação por micro arco, em inglês, *Micro Arc Oxidation* (MAO) usando 200 ml de uma mistura eletrolítica de 0.02 M de β-Glicerofosfato dissódico penta-hidratado (β-GP, Alfa Aesar), 0,35 M de acetato de cálcio monohidratado (CA, Alfa Aesar) e 0,0013 M, 0,013 M ou 0,13 M de hidróxido de estrôncio octa-hidratado (SH, Alfa Aesar) Eletrólitos foram utilizados para incorporar espécies bioativas, como P (de β-GP), Ca (de CA) e Sr (de SH). Os grupos de amostras foram denominados em função da concentração de SH no eletrólito. O tratamento da MAO foi realizado à temperatura ambiente sob uma tensão constante de 300 V com uma corrente limitadora de 2,60 A, durante 1 minuto após atingir a corrente desejada, utilizando uma fonte de alimentação de corrente contínua. As amostras foram conectadas com o ânodo (área igual 2,8 cm²) e uma folha de platina foi usada como cátodo (13 cm²) com uma distância entre o cátodo e o ânodo de 8 cm e todos os tratamentos da MAO foram realizados sob regime turbulento com rotação de 200 rpm. Após o tratamento com

MAO, as amostras foram lavadas em água destilada e secas ao ar. Cada eletrólito foi reutilizado para a produção, no máximo, de 5 amostras após análises preliminares, garantindo a reprodutibilidade em termos de morfologia, fases de óxido e estrutura química.

4.2. Caracterização das superfícies

As amostras foram caracterizadas em relação à topografia e à microestrutura das superfícies por Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em microscópio eletrônico de varredura *FEI Nova 200 field emission gun scanning electron microscope (FEG-SEM)*. Acoplado a Espectroscopia de energia dispersiva (EDS), do inglês *Energy Dispersive Spectroscopy*. A presença dos elementos desejados na superfície foi confirmada pela técnica de difração de raio X (DRX).

4.3. Cultivo celular

4.3.1. Cultivo de osteoclastos humanos

Os monócitos precursores dos osteoclastos foram isolados do sangue humano por gradiente de densidade (CAAE: 1612481960000528, número do parecer de aprovação do Comitê de ética: 3.525.362). Sangue humano de doadores voluntários foi coletado, diluído com uma solução salina de *Hanks' Balanced Salt solution (HANKs)* 1:1 e estratificado ainda na proporção 1:1, delicadamente em uma solução de Ficoll-Paque. As amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 400 rcf sem freios e sem aceleração e o anel na interface (*buffy coat*), contendo monócitos, linfócitos e plaquetas, foi coletado e lavado com PBS 1X e centrifugado a 570 rcf durante 10 minutos. As células foram plaqueadas nas superfícies de titânio CaP-Ti (sem adição de SH), mSr-Ti (0,0013 M de SH), mmSr-Ti (0,013 M de SH) e mmmSr-

Ti (0,0013 M de SH), em uma densidade de 5×10^3 células/cm² e incubadas a 37°C numa atmosfera umidificada com 5% de CO₂, durante 3 horas em meio de cultivo DMEM high contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina). Depois de 3 horas, o meio foi substituído por meio novo da mesma composição, mas suplementado com 20 ng/ml de fator estimulante da colônia monócito-macrófagos M-CSF (*Macrophage Stimulating Factor*) e 30 ng de Receptor ativador do fator nuclear B, RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*). As células foram incubadas durante 14 dias, a cada 3 dias o meio foi substituído e foram adicionadas citocinas na mesma quantidade sobre citada. Desta forma, as células não aderentes (linfócitos) e as plaquetas foram retiradas progressivamente a cada troca de meio, obtendo-se cultura purificada de monócitos. Após 14 dias de cultivo, foram avaliadas a morfologia e a adesão dos osteoclastos diferenciados às superfícies de titânio.

4.3.2. Microscopia de fluorescência

Para os experimentos de adesão, as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 células por / cm² sobre as diferentes superfícies de titânio, colocadas em uma placa de 24 poços e cultivadas a 37°C em atmosfera totalmente umidificada contendo 5% de CO₂, por 4 h e 24 h. A avaliação da adesão celular foi realizada por coloração fluorescente do citoesqueleto de actina (usando Alexa Fluor 546 Phalloidin, Thermo Fisher Scientific, A22283), do núcleo (4',6-diamidino-2-fenilindol-dicloridrato, DAPI, Sigma- Aldrich, F6057) e a fosfatase ácida (TRAP). As células aderentes aos discos, após 14 dias, foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4%, permeabilizadas com Triton X 100 a 0,1% (v/v), e a coloração inespecífica foi bloqueada por incubação em BSA a 3% antes da exposição ao Alexa Fluor 546 Faloidina, TRAP e DAPI. As amostras foram examinadas com um microscópio de

fluorescência invertido com uma câmera digital Axio Observer A1 (Zeiss) equipada com AxioCAM MRm. Foram realizados três experimentos independentes e analisadas pelo menos 4 imagens por condição em cada experimento.

4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura

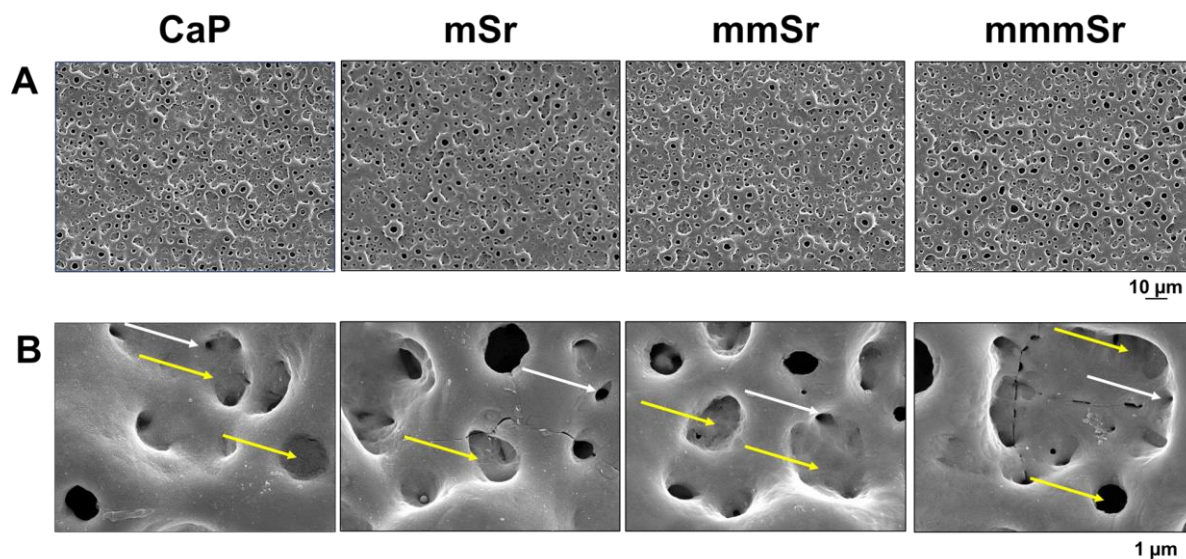
Para avaliar em alta resolução a interação celular com diferentes superfícies as células foram fixadas com Karnovsky (Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2) pós-fixadas com tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio a 0,8%, desidratadas através a imersão em uma série graduada de álcool (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), depois foram secas com hexametildisilazano (HDMS, Sigma-Aldrich). As amostras foram, posteriormente, revestidas por pulverização com ouro e a morfologia celular pôde ser observada por MEV (microscópio FEG-SEM Tescan-Lyra 3) com magnificação de 200x e 400x. O software Image J foi utilizado para quantificar a área celular ocupada utilizando para cada amostra pelo menos quatro imagens e realizando três experimentos independentes.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização das superfícies antes e depois da adesão celular

A morfologia da superfície de cada amostra, apresentou-se como uma rede microporosa rugosa com formato de crateras vulcânicas, resultante dos canais de micro-descargas, que ocorreram durante o tratamento com MAO. Na figura 6A, observa-se que a incorporação do Sr sobre as superfícies, não alterou a topografia da superfície, ou seja, as micro-porosidades permaneceram distribuídas homogeneamente de forma individual, sem modificar o espalhamento e o tamanho médio dos poros sobre cada superfície observada no grupo controle, sem tratamento de superfície. Na análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (LED-SEM), foi verificado que a camada de óxido formada pela técnica de micro arcos, promoveu uma distribuição do tamanho dos poros entre 0,5 e 5 μm com tamanho médio em torno de 2 μm . Na magnificação 10K, observamos a presença de micro (setas amarelas) e nano (setas brancas) porosidades, distribuídas de maneira uniforme nas superfícies tratadas com a técnica de oxidação por micro arcos (Figura 6B).

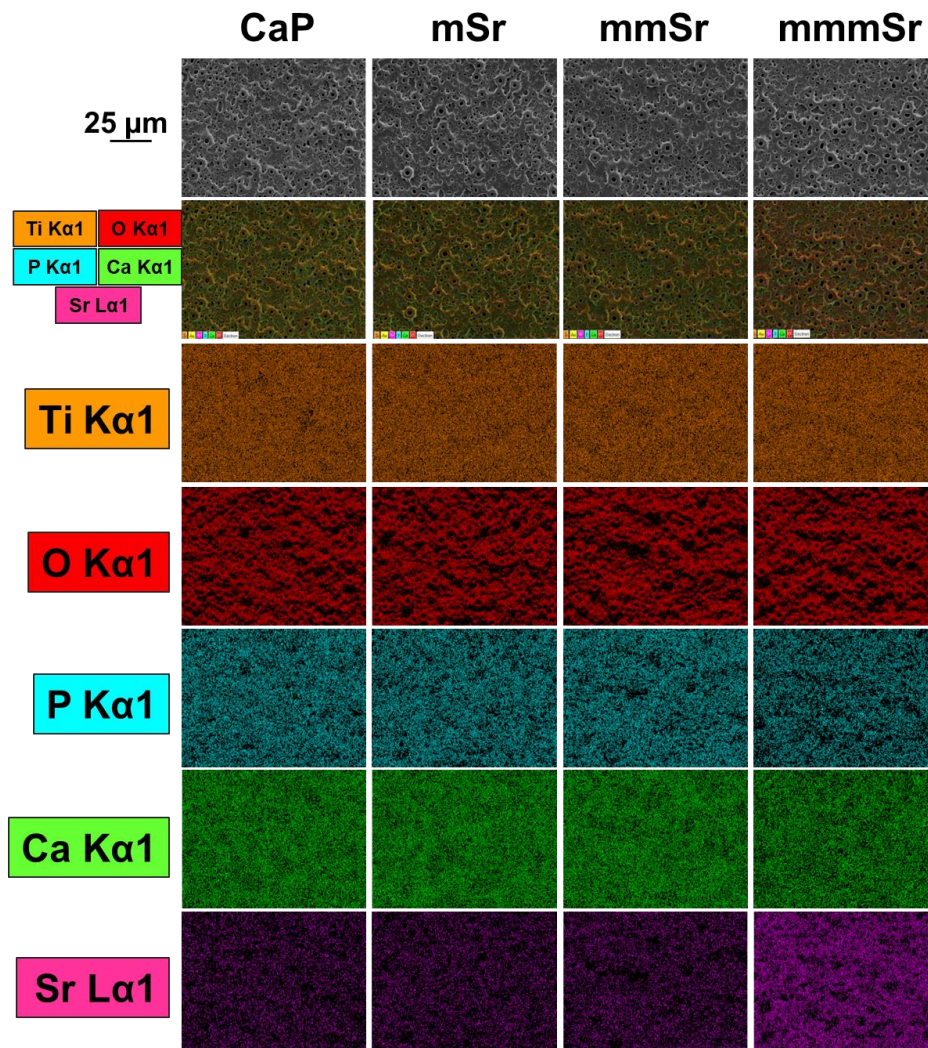
Figura 6. Caracterização das superfícies por microscopia eletrônica de varredura



Fotomicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (LED-SEM) com aumento de (A) 1000x e (B) 10.000x das diferentes superfícies de Ti CaP, Srm, Srmm e Srmmm. As micro-porosidades estão indicadas pelas setas amarelas e as nanoporosidade, pelas setas brancas. Observamos as porosidades distribuídas de maneira uniforme e podemos verificar o tamanho dos poros nas amostras e frequência de distribuição nas superfícies CaP, Srm, Srmm e Srmmm.

Os elementos como Ti (laranja), O (vermelho), P (verde) e Ca (azul), foram detectados na análise elementar por EDS (Figura 7 e 8), confirmando a presença da camada de óxido (Figura 7, painel vermelho, indicando a presença de elemento oxigênio e sua quantificação na Figura 8) e que a incorporação dos elementos bioativos Ca e P (Figura 7, painel verde indicando a presença de cálcio e painel azul indicando a presença de fosfato e suas quantificações na Figura 8) na camada de MAO foi bem-sucedida em todas as superfícies. Contudo, a incorporação de Sr (Figura 7, painel rosa indicando a presença de estrôncio e quantificação na Figura 8) apresenta uma consistência relevante apenas na amostra mmmSr, enquanto as demais amostras mSr e mmSr não apresentam diferenças quantitativas significativas comparadas com o controle CaP (Figura 7 e 8).

Figura 7. Caracterização dos elementos bioativos incorporados às superfícies de titânio por MEV-EDS:

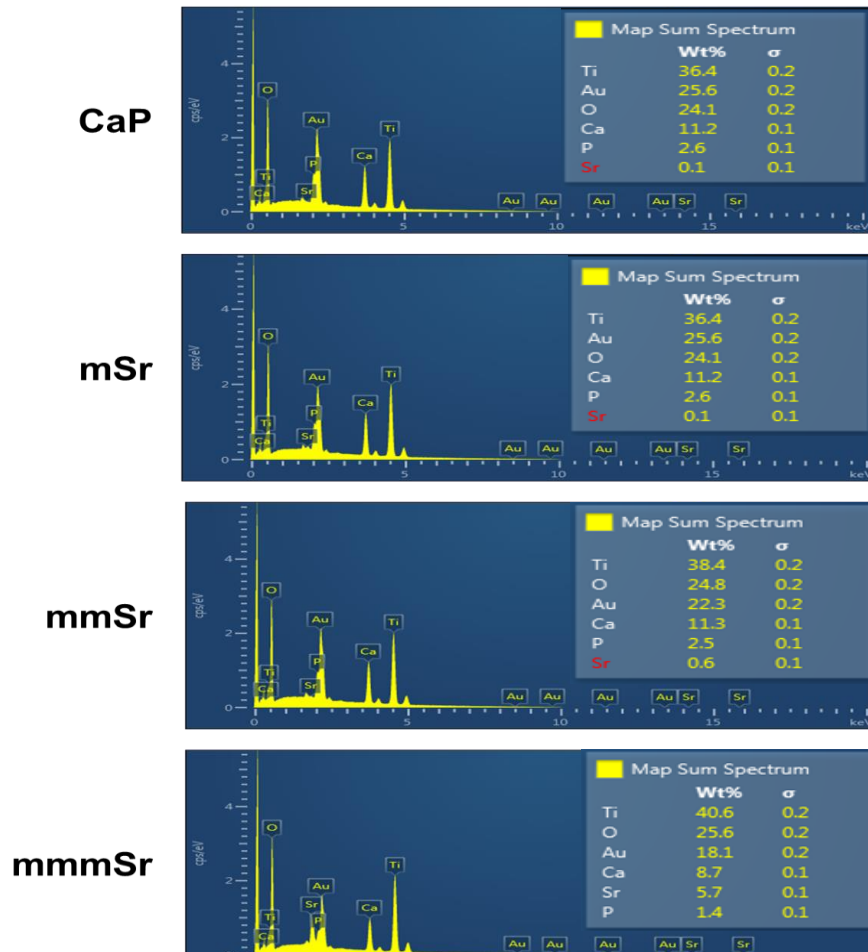


Análises realizadas por MEV – EDS, mostram a presença do titânio (laranja), do oxigênio (vermelho) dos elementos bioativos fosfato (azul) e cálcio (verde) e estrôncio (rosa) incorporados pela MAO nas superfícies de Titânio. O oxigênio e os elementos bioativos cálcio e fosfato se mostram distribuídos de forma homogênea e uniforme sobre todas as superfícies, enquanto a incorporação do estrôncio apresenta diferenças relevantes apenas na superfície mmmSr.

A análise gráfica da espectroscopia por energia dispersiva (EDS) acoplada a MEV mostra que todas as superfícies apresentam quantidades relevantes de óxido, confirmando a presença da camada de óxido obtida por oxidação por micro arcos das superfícies de titânio e de elementos bioativos Ca e P incorporados nas superfícies por esta técnica.

A análise EDS mostrou um conteúdo de estrôncio de $\pm 0,3$; $\pm 0,6$ e $\pm 5,7$ (% em peso) nas amostras mSr, mmSr e mmmSr, respectivamente, com a superfície mmmSr apresentando uma quantidade significativa da presença do Sr em relação às demais amostras (Figura 8).

Figura 8. Caracterização semi-quantitativa dos elementos bioativos nas superfícies de titânio (MEV-EDS).

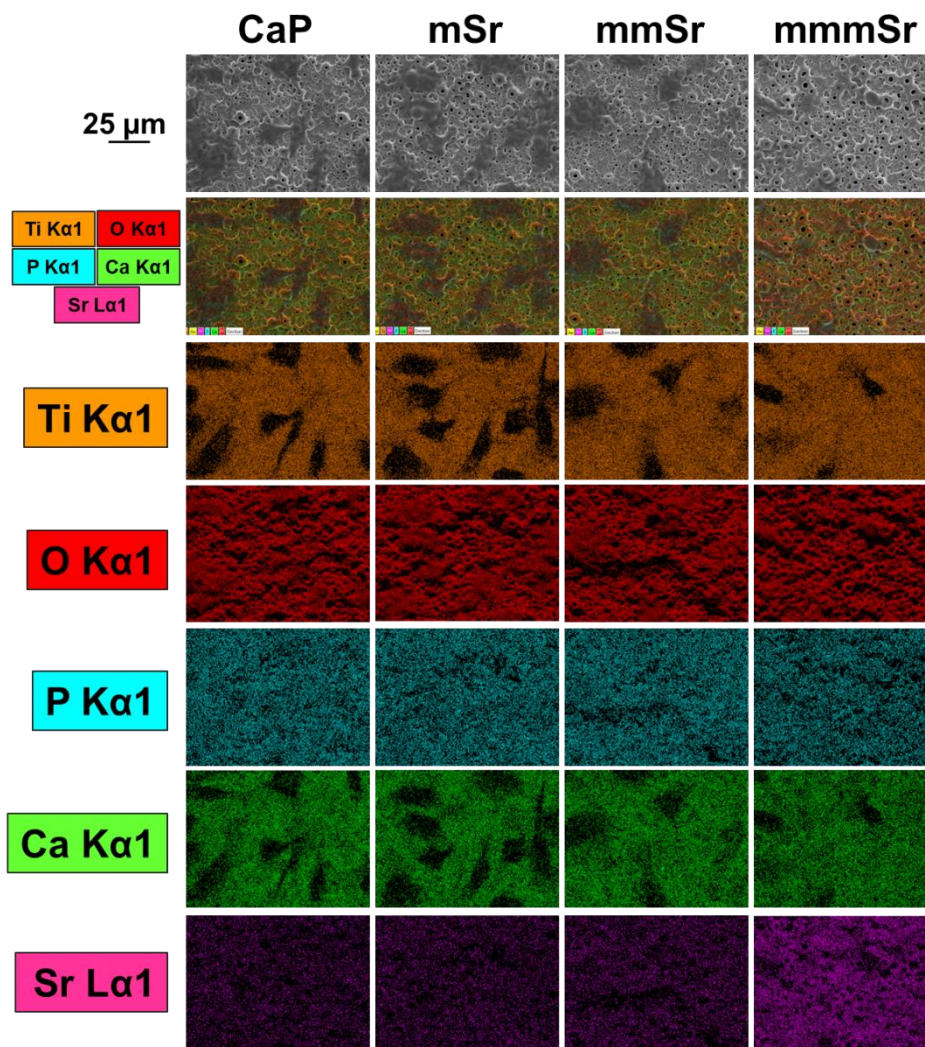


Pela análise EDS verificou-se que as quantidades relativas aos picos de Sr nas amostras CaP, mSr e mmSr encontram-se destacados na cor vermelha em relação à porcentagem total no peso do elemento presente, indicando concentrações muito baixas em relação aos demais elementos.

As mesmas análises foram repetidas após a adesão das células nas superfícies não mostrando uma alteração significativa na presença dos elementos, mas podendo

verificar-se a presença de manchas escuras na distribuição dos elementos titânio e cálcio, nas áreas ocupadas pelas células (Figura 9).

Figura 9. Caracterização dos elementos bioativos incorporados às superfícies de titânio por MEV-EDS após a adesão celular

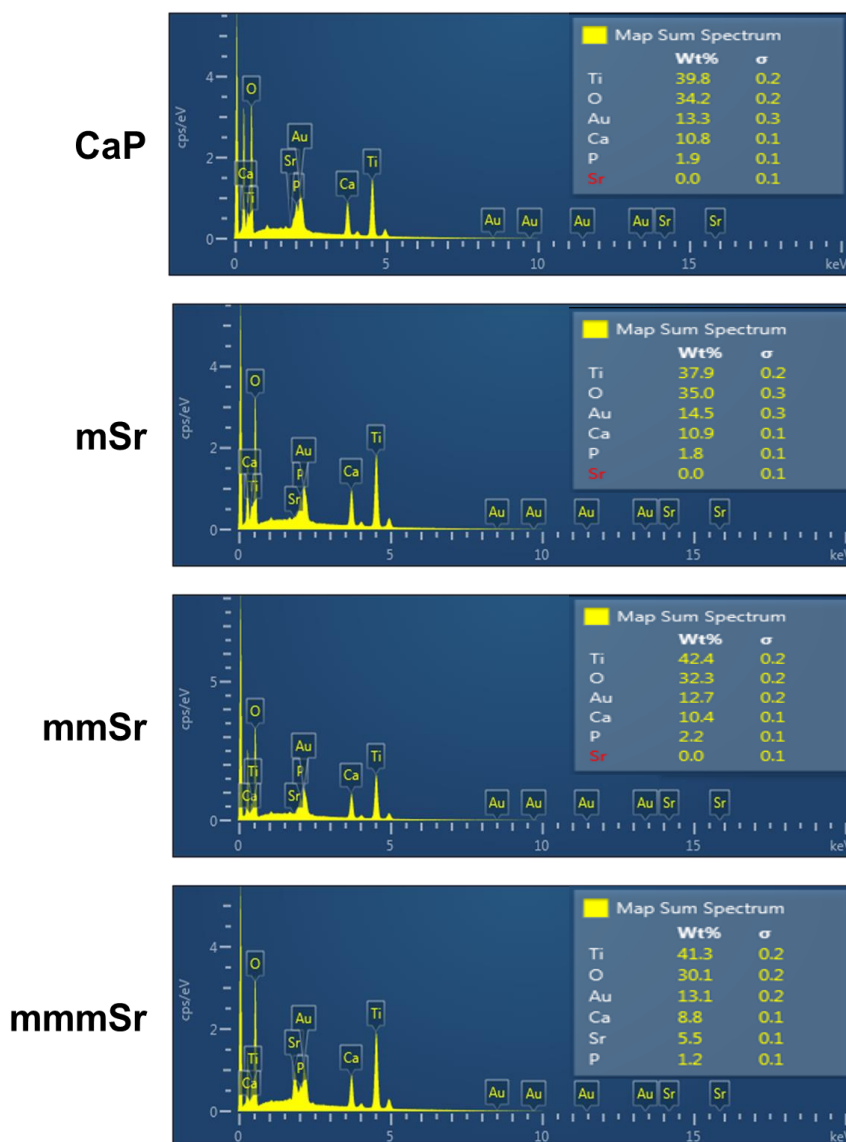


Análises realizadas por MEV – EDS, mostram a presença do titânio (laranja), do oxigênio (vermelho) dos elementos bioativos fosfato (azul), cálcio (verde) e estrôncio (rosa) incorporados pela MAO nas superfícies de Titânio. O oxigênio e os elementos bioativos cálcio e fosfato se mostram distribuídos de forma homogênea e uniforme sobre todas as superfícies, enquanto a incorporação do estrôncio apresenta diferenças relevantes na superfície mmmSr.

Os espectros gerados por MEV-EDS dos elementos bioativos incorporados às superfícies de titânio por MEV-EDS, após a adesão celular, confirmam mais uma vez

a baixa quantidade de estrôncio encontrado nas superfícies de mSr e mmSr comparadas com a mmmSr, que apresenta uma quantidade maior (Figura 10), sem diferenças significativas com a mesma amostra analisada antes da adesão celular (Figura 8).

Figura 10. Caracterização semi-quantitativa dos elementos bioativos nas superfícies de titânio (MEV-EDS), após adesão celular

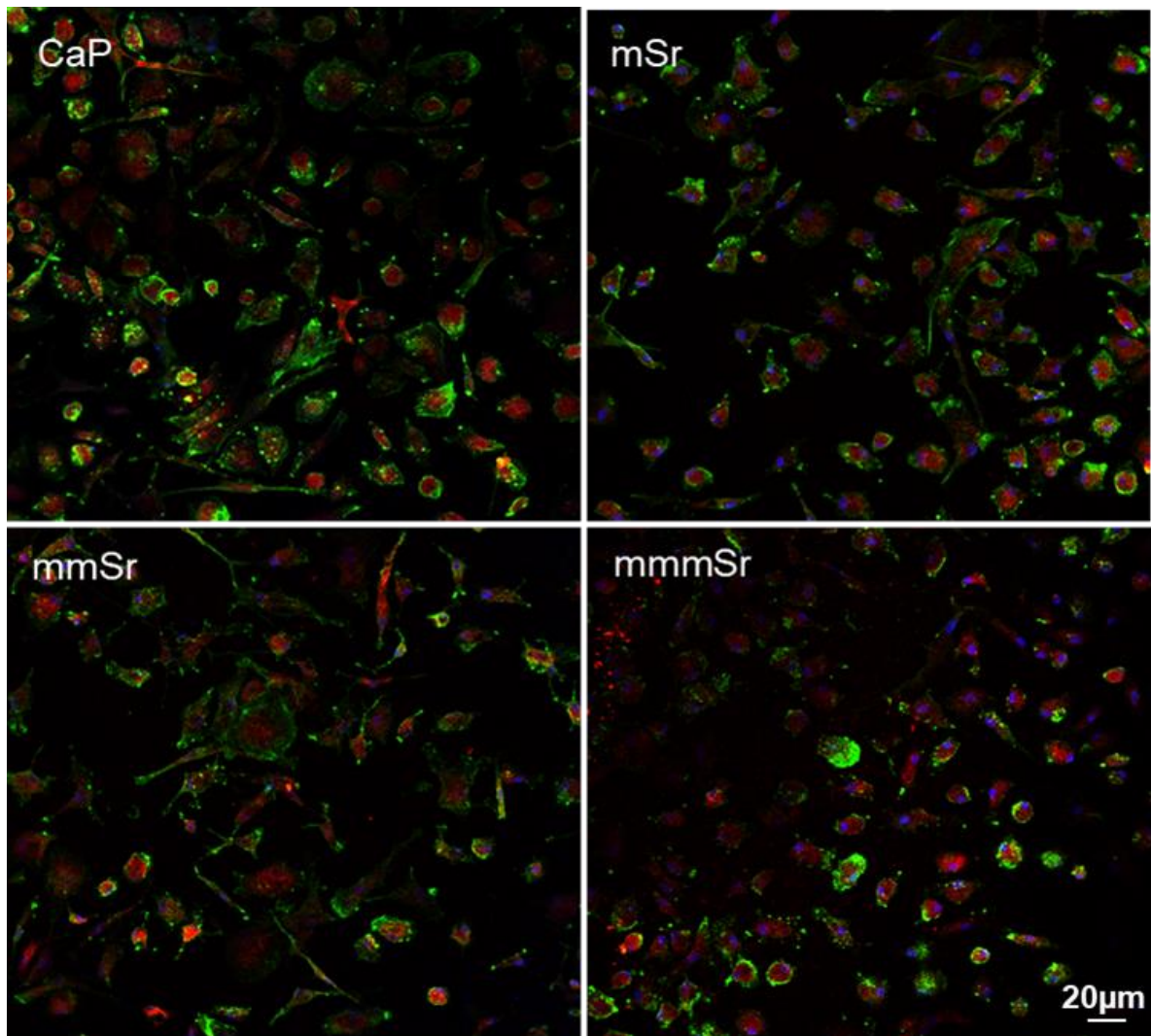


Após a adesão celular, as quantidades relativas aos picos de Sr nas amostras CaP, mSr e mmSr encontram-se ainda baixas e destacadas na cor vermelha em relação à porcentagem total indicando concentrações muito baixas em relação aos demais elementos. A análise EDS apresentou a incorporação de Sr com um conteúdo de % de 0,0 nas amostras mSr e mmSr, e $\pm 5,5$ na amostra mmmSr.

5.2. Avaliação da diferenciação de osteoclastos sobre a superfície caracterizada

A interação celular com as superfícies foi avaliada por meio de imagens de microscopia de fluorescência. Observamos que todas as superfícies apresentam uma boa adesão de monócitos e osteoclastos com células espalhadas e citoesqueleto intacto. Foi possível observar células com um citoesqueleto de actina bem-organizado, com morfologia fusiforme, extensões de filopódios proeminentes e múltiplos núcleos com diferente tamanho celular dependendo da superfície (Figura 11).

Figura 11. Adesão celular nas superfícies de titânio incorporadas com elementos bioativos

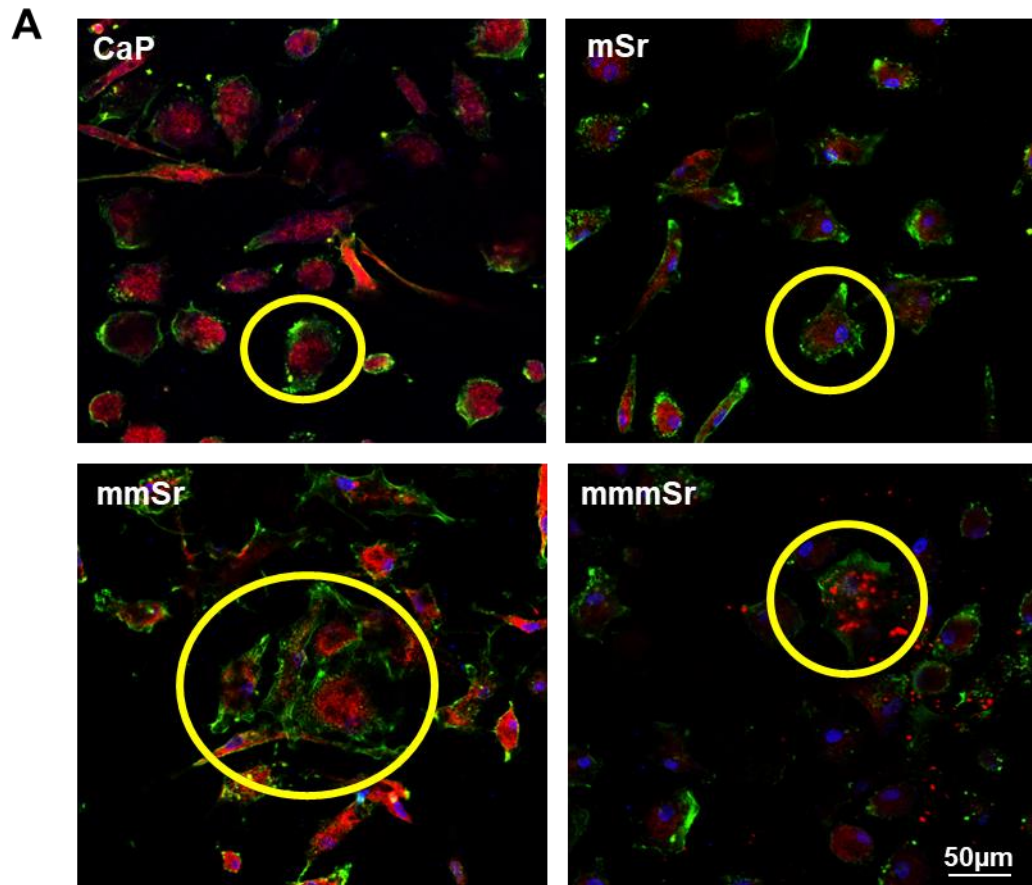


Fotomicrografias de fluorescência de monócitos em diferenciação aderidos nas superfícies de titânio incorporadas com elementos bioativos. Os monócitos, em presença de citocinas osteoclastogênicas por 14 dias em contato com as superfícies de CaP, mSr e mmSr e mmmSr. As imagens mostram a F-actina (coloração com faloidina 488), fosfatase ácida (com coloração em vermelho, emissão a 546 nm) e os núcleos marcados com DAPI em azul (emissão em 350 nm), em um aumento de 20x.

Para verificar a influência do estrôncio na osteoclastogênese nas diferentes superfícies de titânio foi quantificado o número de células diferenciadas durante 14 dias, em presença de citocinas osteoclastogênicas, identificadas positivamente com

fosfatase ácida tartarato resistente, marcador de osteoclastos. Os resultados mostraram um aumento do número de osteoclastos e diminuição do número de monócitos nas células plaqueadas na superfície mmSr comparada com o controle incorporado apenas com CaP (Figura 12).

Figura 12 Células TRAcP positivas diferenciadas nas superfícies incorporadas com elementos bioativos



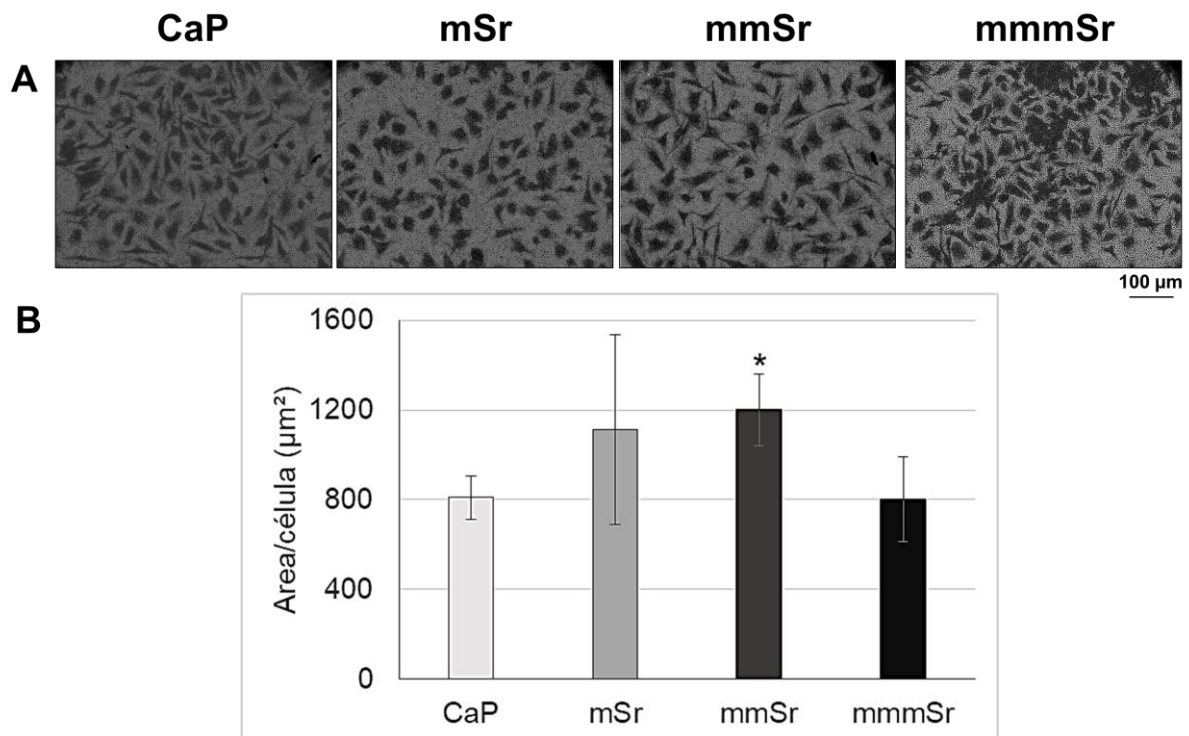
B

20x	CaP		mSr		mmSr		mmmSr	
	Monócito	Osteoclasto	Monócito	Osteoclasto	Monócito	Osteoclasto	Monócito	Osteoclasto
Exp 1	137	7	67	7	123	9	148	3
Exp2	125	14	97	9	86	9	161	5
Exp3	92	4	93	9	87	11	103	13
Exp4	35	1	34	5	21	5	20	4

Monócitos e osteoclastos diferenciados em superfícies de titânio. (A) Imagem representativas de imunofluorescência por fosfatase ácida e (B) quantificação de monócitos e osteoclastos formados sobre as superfícies de CaP; mSr; mmSr e mmmSr.

Para avaliar de forma mais precisa a interação das células com as superfícies incorporados com diversos elementos bioativos, foi calculada a área total de adesão celular nas superfícies, após a diferenciação de monócitos em osteoclastos, durante 14 dias, em presença de citocinas pró-osteoclastogênicas. Por isso, foram realizadas fotomicrografias por MEV usando a técnica de elétrons retroespalhados, que permite revelar a diferença de composição da amostra a partir do núcleo atômico dos elementos que a compõem. Quanto maior o número atômico a imagem aparece mais clara (como no caso do titânio, metal com número atômico de 22) e onde tem menor número atômico (material biológico com oxigênio (8), carbono (6) e nitrogênio (7)). Os resultados mostram um aumento significativo de área total ocupada pelas células plaqueadas na superfície mSr comparada com o controle CaP (Figura 13).

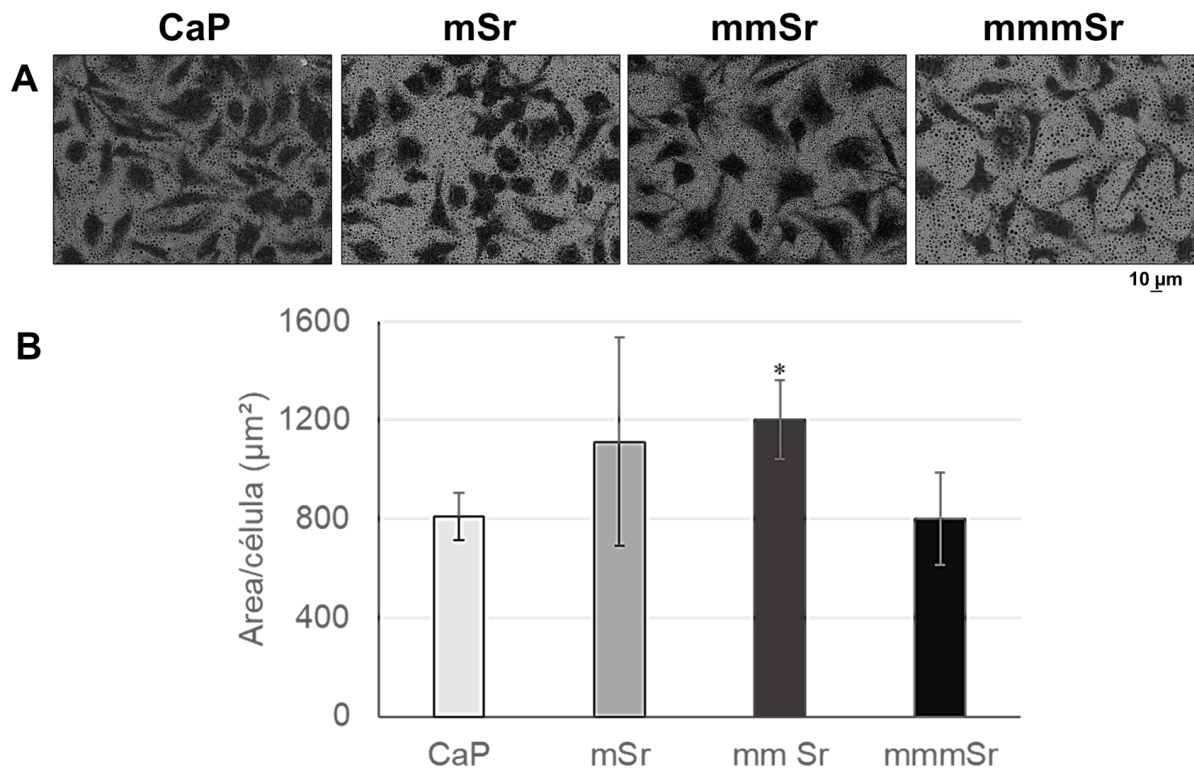
Figura 13. Área total ocupada por células após interação com superfícies de titânio incorporadas com os diferentes elementos bioativos



(A) Fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão em baixo aumento (200x) obtidos por elétrons retroespalhados da osteoclastogênese sobre as superfícies de titânio CaP, Sr, Srmm e Srmmm, após 14 dias de interação em presença de citocinas osteoclastogênicas e (B) o gráfico mostrando a quantificação da área celular total ocupada. Os dados são a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes com * $p=0,05$ vs o controle CaP. A escala de medidas corresponde a 100 μm.

Devido à diferença do número de osteoclastos e do tamanho maior que estas células ocupam comparados com a sua contraparte não diferenciada, o monócito, foi repetida a mesma análise de cálculo de área ocupada usando fotomicrografias capturadas com um aumento maior para obter mais precisão e normalizando os resultados por número de células. Os resultados mostraram um aumento significativo da área ocupada por células após interação celular com a superfície de mm Sr comparada com o controle, superfície CaP. Este aumento corrobora com os dados anteriores que mostravam um aumento do número de osteoclastos diferenciados na superfície mmSr (Figura 14).

Figura 14. Área ocupada por células após interação com superfícies de titânio incorporadas com os diferentes elementos bioativos normalizada por número de células



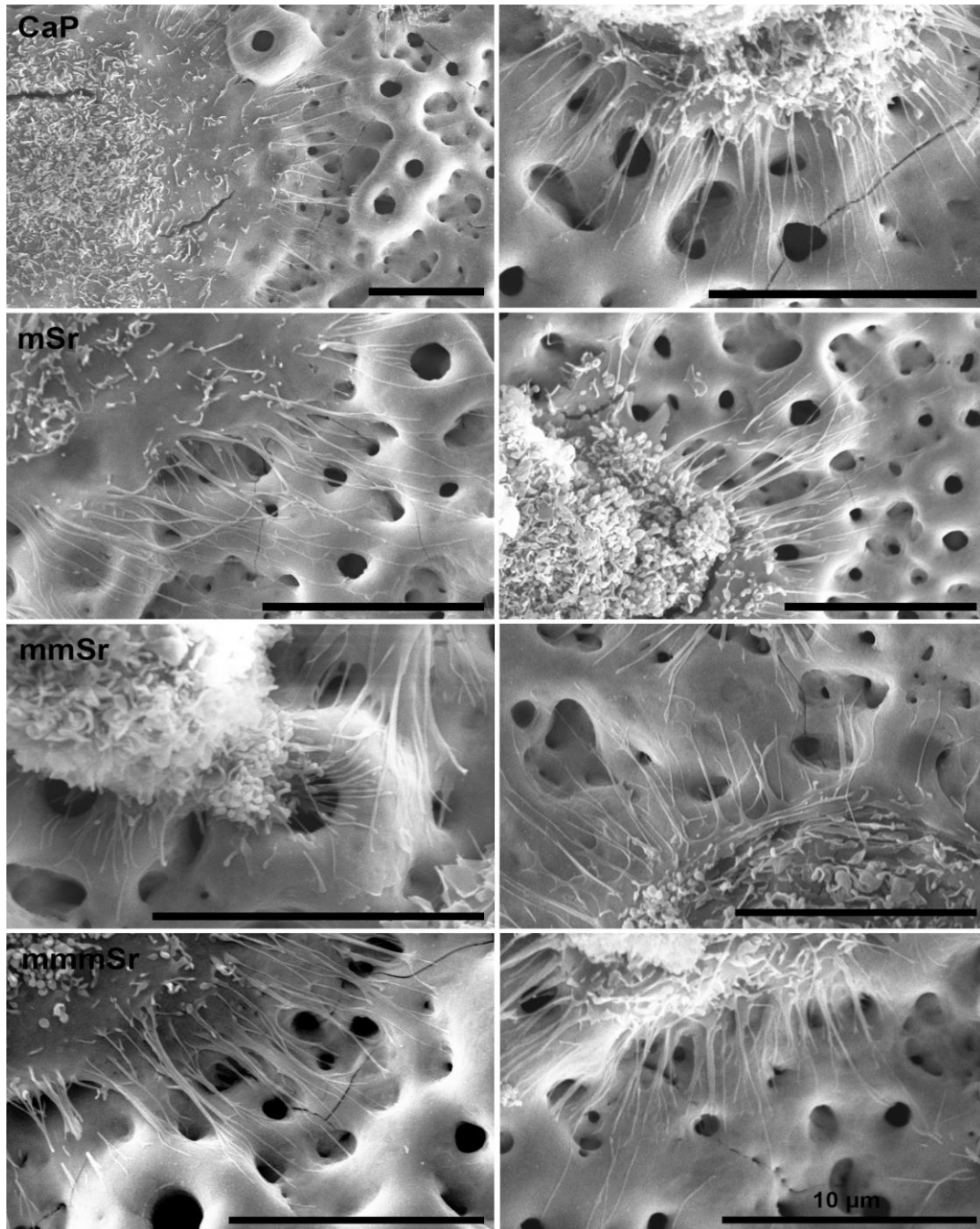
(A) Fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão em alto aumento (400x) obtidos por elétrons retroespalhados da osteoclastogênese sobre as superfícies de titânio CaP, Srm, Srm m e Srm m m, após 14 dias de interação em presença de citocinas osteoclastogênicas e (B) o gráfico mostrando a quantificação da área celular total. Os dados são a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes com * $p=0,02$ vs o controle CaP. A escala de medidas corresponde a 10 µm.

5.3. Interação celular em nanoescala de osteoclastos com a superfície caracterizada

Para avaliar a interação celular com o micro e o nano poros presentes nas superfícies foram realizadas análises em alta magnificação por microscopia eletrônica de varredura. Desta forma, foi possível observar que os osteoclastos aparecem, em todas as superfícies interagindo com os poros do material, cobrindo a superfície porosa do óxido e aderidas às bordas dos poros, penetrando e cruzando com os

prolongamentos celulares, tanto os poros micrométricos quanto os nanométricos (figura 15).

Figura 15: Interação em nanoescala dos osteoclastos com as superfícies incorporados com diferentes elementos bioativos



Fotomicrografias eletrônicas de varredura em alta magnificação, mostrando os prolongamentos celulares aderindo e interagindo com as micro e nano porosidade da superfície tratada por MAO. A escala de medida corresponde a 10 μm.

6. DISCUSSÃO

Os implantes dentários, produzidos com titânio, têm apresentado uma alta taxa de sucesso e se consagrado como uma opção de tratamento para a reposição dentária, atuando como suporte para a prótese (AKINTOYE *et al.*, 2018). Este sucesso depende da interação com o sistema biológico e com os elementos celulares presentes, e, em grande parte, do balanço entre a ativação de osteoblastos e osteoclastos (WANG YU *et al.*, 2018).

Para otimizar a osteointegração, diferentes técnicas têm sido propostas para modificação da superfície de titânio. As pesquisas iniciais foram focadas, principalmente, na geometria dos implantes, no intuito de melhorar os resultados clínicos e o sucesso a longo prazo. Posteriormente, o foco de interesse passou a ser a modificação da topografia e química da superfície dos implantes (WEHNER *et al.*, 2020).

O objetivo deste projeto foi compreender a interação de osteoclastos primários humanos com superfícies de TiO₂ tratadas por MAO, e incorporadas com Cálcio (Ca), Fósforo (P) e Estrôncio (Sr) em três diferentes concentrações. Em um artigo anterior do grupo, publicado em 2020 em colaboração com o CMEMS-UMinho, foi relatado como superfícies de Ca-P-TiO₂ com menor concentração de Sr se mostraram promissoras para aprimoramento de implantes, melhorando a produção de matriz orgânica sem comprometimento da adesão celular nem da viabilidade após a interação de osteoblastos (COSTA *et al.*, 2021).

A técnica de tratamento com MAO permite a incorporação de elementos bioativos durante a conversão de superfície de metal de Ti para o seu óxido, que

podem ser cálcio (Ca), fósforo (P), silício (Si) e prata (Ag). Através de descargas eletrolíticas altas temperaturas são alcançadas, gerando uma fusão desses elementos bioativos, presentes no eletrólito, à superfície de titânio. Já foi demonstrado que a incorporação de diferentes concentrações de Sr por MAO, não promove alteração na porosidade da superfície de titânio, comparada às superfícies com a adição de Ca e P (ALVES *et al.*, 2013).

A superfície dos implantes é de fundamental importância para o sucesso da reabilitação oral, pois é crucial que ocorra uma perfeita comunicação do implante com o tecido ósseo (LI *et al.*, 2020b). Estudos mostram como a estabilidade total de um implante é a soma da estabilidade primária e da secundária (ROCHA *et al.*, 2010; KITTUR *et al.*, 2021). A estabilidade primária é a resistência máxima ao movimento do implante no final da inserção, já a estabilidade secundária é obtida com a osseointegração, processo essencial para que haja o ancoramento estável do implante descrito inicialmente por Brånemark e colaboradores (ALBREKTSSON *et al.*, 2019). De acordo com Elias *et al.*, 2011, a estabilidade primária de um implante dentário depende da forma do implante e da morfologia da superfície, enquanto a estabilidade secundária depende principalmente da superfície do implante (HEITZER *et al.*, 2022).

Os resultados mostrados pelas eletromicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura demonstraram que as superfícies, incorporadas com CaP e diferentes concentrações de Sr, apresentam nano e microporosidades de forma uniformemente distribuída independente da composição química da amostra. As superfícies dos implantes osseointegrados, em sua grande maioria consideradas como moderadamente rugosas (ALBREKTSSON *et al.*, 2019), são preparadas e/ou

modificadas usando materiais produzidos em escala micrométrica ou nanométrica, e em muitos casos recebem, também, um tratamento químico, que melhora a adesão celular (ELLINGSEN *et al.*, 2004). Desta forma as superfícies produzidas por MAO são interessantes para melhorar a adesão celular e, portanto, a osteointegração.

Além disso, o desenvolvimento de superfícies nano-estruturadas nos implantes osteointegrados, pode aumentar consideravelmente a adesão de células ósseas e também a produção de matriz óssea necessária no processo de mineralização e manutenção do osso que circunda o implante (GUTWEINET *et al.*, 2004; CERQUENI *et al.*, 2021).

Estas porosidades permitem uma melhor aderência e espalhamento celular sobre a superfície, além permitir a entrada de vasos e nervos dentro das porosidades e de proporcionarem uma distribuição dos elementos bioativos dentro das camadas de óxido de Ti tratadas com Sr-MAO.

A análise gráfica da espectroscopia por energia dispersiva (EDS) da MEV foi realizada para avaliar as diferentes concentrações, em porcentagem de peso, existentes em cada amostra, já que cada elemento tem uma assinatura de absorção e outra de emissão. A incorporação de Sr, assim como a de Ti, O, Ca e P foram detectadas, mostrando que a adição desses elementos por MAO foi bem-sucedida nas amostras mSr, mmSr e mmmSr. O Sr se mostrou distribuído uniformemente na superfície para todas as condições, como pôde ser observado nas imagens de (MEV-EDS) e sem alterações significativas dos elementos bioativos não muda após o plaqueamento celular. Foi também mostrada a presença de oxigênio colocalizado com o titânio, confirmando a presença de uma camada de óxido de titânio, gerada pela

técnica de MAO, recentemente correlacionada com o aumento da osteointegração (SHEN *et al.*, 2022).

Estudos apontam que é mais fácil incorporar Ca e Sr do que P, pois os elementos catiônicos como Ca^{2+} e Sr no eletrólito foram mais atraídos pelo cátodo e repelidos do ânodo durante o tratamento com MAO, devido ao forte campo elétrico. De fato, o acetato de cálcio e o hidróxido de estrôncio dissolvem facilmente na água e, dessa forma, combinam-se com íons OH^- e se movem em direção às áreas de faíscas incorporadas na camada de óxido enquanto a tensão aumenta (Y LU *et al.*, 2014). No grupo preparado com maior quantidade de Sr (mmmSr), os elementos Ca e P foram menos incorporados do que nas outras condições, uma vez que a concentração de Sr estava maior nos sais de composição do eletrólito.

Ainda, os resultados mostraram o baixo pico de Sr nas amostras mSr e mmSr, de acordo com os limites de detecção da técnica e equipamento utilizados, o que pode estar relacionado à baixa concentração de Sr incorporada nessas superfícies (0,0013 M e 0,013 M, respectivamente nas superfícies mSr e mmSr), durante o processo de fabricação. Contudo, o Sr é um elemento que atua de forma dose dependente com efeitos em concentrações de ppm na estimulação da osteogênese, inibindo a reabsorção óssea em doses entre 2-5 ppm e inibindo a calcificação em concentrações entre 20-100 ppm (SAKAI *et al.*, 2012), portanto o seu efeito biológico é esperado mesmo quando presente em concentrações baixas.

A liberação constante de *in situ* de Sr é considerada promissora para melhorar a osseointegração na interface implante/osso, como mostrado por estudos recentes comprovando os benefícios dose dependentes da incorporação de Sr nos biomateriais (LI *et al.*, 2018), tanto em modelos animais (MARX *et al.*, 2020) quanto em ensaios

clínicos (BOIVIN *et al.*, 2008). O estrôncio pode inibir a reabsorção óssea, reduzindo a produção de metaloproteinase da matriz dos osteoblastos, reduzindo assim a atividade de diferenciação e reabsorção dos osteoclastos e induzindo a apoptose dos osteoclastos. Estudos mostram como a presença de estrôncio na interface da superfície do implante/tecido e uma liberação controlada de Sr a longo prazo conferem ao biomaterial uma maior capacidade de promover osteogênese e, assim, alcançar osseointegração rígida do implante (DANG *et al.*, 2016; SHEN *et al.*, 2022).

Após uma extensa caracterização das superfícies, monócitos foram plaqueados em presença de citocinas para avaliar a interação celular com as superfícies.

As análises por microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura com elétrons retro espalhados mostraram uma boa interação com as células espalhadas e citoesqueleto bem-organizado. Os resultados da microscopia eletrônica de transmissão em alto aumento mostram também uma interação dos prolongamentos celulares com os nano e microporos presentes nas superfícies.

Estudos demonstram que a rugosidade da superfície possibilita maior área de contato entre o material e o tecido ósseo, além da adição de diferentes componentes, que podem atuar no metabolismo do tecido ósseo, no intuito de direcioná-lo para a formação do tecido ósseo, de modo a integrar o implante (PELLEGRINI *et al.*, 2018).

Ainda foi possível observar uma maior área ocupada pelas células e um maior número celular na superfície de mmSr.

O estrôncio é um elemento traço com raio e carga iônica similar ao cálcio e, em função disso, contribui para processos biológicos no corpo humano (GRUBER, 2019), podendo aumentar a atividade de células tronco mesenquimais, provenientes de tecidos normais ou com algum comprometimento do metabolismo ósseo (BRAUX *et*

al., 2011; BONNELYE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2020). Por essa razão, ele tem sido utilizado como um agente biologicamente ativo na terapia da osteoporose, podendo ser citado o ranelato de estrôncio (BURLET *et al.*, 2006; MARIE *et al.*, 2011; MOSEKE *et al.*, 2020). TAO e colaboradores (2016) verificaram que implantes, submetidos a tratamentos de superfície com 20% de estrôncio, levaram à osseointegração em ratos com osteoporose.

Resultados anteriores do grupo mostraram como as superfícies de titânio com a incorporação de estrôncio na concentração de 0,013 M tiveram um efeito bioestimulador para produção de matriz orgânica de colágeno pelos osteoblastos sem diferenças significativas em relação a produção de matriz inorgânica, quando comparadas com o controle CaP. Contudo, para garantir biocompatibilidade e efeito bioestimulador da superfície, precisa avaliar o quadro completo das dinâmicas ósseas envolvidas, tanto os efeitos na formação óssea realizada pelos osteoblastos, quanto os efeitos na reabsorção realizada pelos osteoclastos (MARX *et al.*, 2020).

O metabolismo ósseo é o resultado de um balanço delicado entre osteoblastos e osteoclastos, mediada por um complexo mecanismo de interação celular mediado por citocinas. Para que se tenha uma bioestimulação correta que leve a osseointegração precisa-se garantir a presença de osteoclastos que possam realizar o remodelamento ósseo, sem comprometer a estabilidade do implante.

Alguns estudos mostraram que altas concentrações de estrôncio, incorporadas em superfícies de titânio, inibiram a formação de células multinucleadas (MOSEK *et al.*, 2020). Entretanto, o efeito do Sr é dose-dependente na estimulação da osteogênese em baixas doses (2-5 ppm), aumentando a replicação e a diferenciação dos osteoblastos bem como a mineralização da matriz óssea, além de atuar na inibição

da osteoclastogênese e da calcificação em altas doses (20-100 ppm), reduzindo, também, a produção de metaloproteinase da matriz e diminuindo, assim, a atividade de diferenciação e reabsorção e induzindo a apoptose dos osteoclastos quando presente em altas doses (entre 20-100 ppm).

A literatura mostra que os íons de Sr apresentam efeitos de osteoindução na liberação local de íons no osso que pode ser diferente do efeito estimulado por uma administração sistêmica (MARX *et al.*, 2020).

A superfície mmSr é promissora pela bioestimulação da matriz inorgânica de colágeno produzido pelos osteoblastos, uma vez que se busca, inicialmente, a estabilidade primária do implante no tecido ósseo, a qual, frequentemente, é relacionada ao sucesso do tratamento (COSTA *et al.*, 2021). Entretanto, após essa interação inicial do implante com o tecido ósseo, ocorre remoção progressiva do tecido ósseo, criando espaço para a formação de novo osso lamelar e substituindo a estabilidade primária passiva pela fixação secundária ativa por meio de uma ligação biológica (HARADA *et al.*, 2003). Sendo assim, a remodelação óssea é necessária para que se alcance a estabilidade secundária do implante e sua efetiva osseointegração. Ela requer a participação tanto de osteoblastos como osteoclastos, de maneira extremamente orquestrada e sintonizada. A inibição da atividade dos osteoclastos pode, portanto, comprometer o processo de remodelação óssea e consequentemente a integração do implante ao tecido ósseo.

Deve-se considerar, também, que a atuação do estrôncio sobre osteoblastos e osteoclastos acontecerá, simultaneamente, quando se pensa na interação com o tecido ósseo. Portanto, a ativação ou inibição de um tipo celular, também, poderá levar, de maneira indireta, à modulação de outro, fazendo-se necessários estudos

mais aprofundados usando o meio condicionado pelas células que interagiram com as diferentes superfícies. Por exemplo, uma vez que os implantes dentários são submetidos a constantes cargas, o que é inerente a sua função, deve ser, ainda, avaliada sua resistência mecânica, após sua modificação de superfície. Além disso, esses implantes biofuncionalizados, após serem submetidos aos ensaios mecânicos funcionais, devem passar novamente pelos ensaios de caracterização de superfície para verificar se as características físico-químicas não foram afetadas. Além disso, deve-se, também, avaliar a interação célula-material, isto é, se o comportamento celular, frente às superfícies tratadas sofreu alguma modificação. Além disso, o estrôncio potencialmente liberado, a partir da superfície de titânio tratada, também poderá ser incorporado ao tecido ósseo neoformado no processo de remodelação, podendo gerar um efeito secundário.

7. CONCLUSÃO

A técnica de MAO é um método simples e rápido, a qual permite a incorporação de elementos biotivos sobre as superfícies de Ti. A incorporação de Sr não afetou o tamanho dos poros e a morfologia da camada de TiO_2 . Contudo a presença de diferentes quantidades de estrôncio modificou o comportamento celular. Um maior número de osteoclastos e uma maior área celular total superficial e um maior tamanho celular foram observados após a interação com a superfície mmSr, incorporada com um estrôncio na concentração de 0,013 M comparadas com o controle CaP e com as demais superfícies mSr e mmmSr incorporadas com estrôncio na concentração 0,0013 M e 0,13 M, respectivamente. Em vista do fato que o metabolismo ósseo é resultado de um delicado equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, a superfície de mmSr que já tinha mostrado um aumento da bioestimulação de colágeno pelos

osteoblastos, se mostrou promissora para aplicação em implantes dentários e outras aplicações de regeneração óssea.

Os processos de formação e de reabsorção, fundamentais para a remodelação óssea, podem, portanto, ser modulados por diferentes concentrações de estrôncio, incorporadas às superfícies de titânio. Em pacientes com falhas no metabolismo ósseo, torna-se de grande importância, favorecer, normalmente, a via de formação óssea e controlar a reabsorção óssea, de modo que haja remodelação e posterior osseointegração. Os ensaios *in vitro* constituem uma importante ferramenta para que seja realizado um *screening* inicial de concentrações de estrôncio e interação célula-material. Dessa maneira é possível selecionar concentrações que promovam, ao mesmo tempo, o comportamento desejado, tanto em osteoblastos como em osteoclastos. Numa avaliação posterior, realizada essa seleção inicial, podem ser realizados ensaios com o meio condicionado por esses tipos celulares e, ainda, avaliações em que ambos interagem, ao mesmo tempo, com as superfícies avaliadas. Dessa forma, os ensaios *in vivo* e, posteriormente, os estudos clínicos para avaliação de segurança e eficácia, poderão ser realizados de maneira mais otimizada e segura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINTOYE, S. O. The distinctive jaw and alveolar bone regeneration. **Oral Diseases**, v. 24, n. 1–2, p. 49–51, 2018.

AKINTOYE, S. O.; BOYCE, A. M.; COLLINS, M. T. Dental perspectives in fibrous dysplasia and McCune-Albright syndrome. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 116, n. 3, p. e149–e155, 2013.

ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. On osseointegration in relation to implant surfaces. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 21, n. S1, p. 4–7, 2019.

AMLER, M. H.; JOHNSON, P. L.; SALMAN, I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 61, n. 1, p. 32–44, 1960.

ARTIGAS, N. et al. Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-regulated interactions between osterix and Runx2 are critical for the transcriptional osteogenic program. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 39, p. 27105–27117, 2014.

AZZI, M.; SZPUNAR, J. A. Tribo-electrochemical technique for studying tribocorrosion behavior of biomaterials. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 5, p. 443–446, 2007.

BERGER, J. M. et al. Mediation of the Acute Stress Response by the Skeleton. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 5, p. 890- 902.e8, 2019.

BOIVIN, G. et al. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. **Bone**, v. 43, n. 3, p. 532–538, 2008.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 2, p. 229–238, 2011.

BONNELYE E, CHABADEL A, SALTEL F, et al. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **BONE**. 2008;42(1):129– 138. doi:10.1016/j.bone.2007.08.04324.

BRÅNEMARK, P. I. et al. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. **Biomaterials**, v. 4, n. 1, p. 25–28, 1983.

BRAUX J, VELARD F, GUILLAUME C, et al. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation. **Acta Biomater**. 2011;7(6):2593–2603. doi:10.1016/j.actbio.2011.02.01323.

BUCK, D. W.; DUMANIAN, G. A. Bone biology and physiology: Part I. the fundamentals. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 129, n. 6, p. 1314–1320, 2012.

BURLET N, REGINSTER JY. Strontium ranelate: the first dual acting treatment for postmenopausal osteoporosis. **Clin Orthop Relat Res** 2006; 443:55–60. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000200247.27253.e9>.

CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, n. May, p. 3–12, 2014.

CERQUENI, G., SCALZONE, A., LICINI, C., GENTILE, P., & MATTIOLI-BELMONTE, M. (2021). Insights into oxidative stress in bone tissue and novel challenges for biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, 130, 112433.

CHEN, Y. et al. The Characterization and Osteogenic Activity of Nanostructured Strontium-Containing Oxide Layers on Titanium Surfaces. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 31, n. 4, p. e102–e115, 2016.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical journal of the American**

Society of Nephrology : CJASN, v. 3 Suppl 3, p. 131–139, 2008.

CORDERO, D. R. et al. Cranial neural crest cells on the move: Their roles in craniofacial development. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 155, n. 2, p. 270–279, 2011.

COSTA, A. I., GEMINI-PIPERNI, S., ALVES, A. C., COSTA, N. A., CHECCA, N. R., LEITE, P. E., ... & RIBEIRO, A. R. (2021). TiO₂ bioactive implant surfaces doped with specific amount of Sr modulate mineralization. **Materials Science and Engineering: C**, 120, 111735.

DALLAS, S. L.; PRIDEAUX, M.; BONEWALD, L. F. The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 5, p. 658–690, 2013.

DANG, Y. et al. In vivo osseointegration of Ti implants with a strontium-containing nanotubular coating. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1003–1011, 2016.

DEL FATTORE, A.; CAPANNOLO, M.; TETI, A. New mechanisms of osteopetrosis. **IBMS BoneKEy**, v. 6, n. 1, p. 16–28, 2009.

FRANZ-ODENDAAL, T. A.; HALL, B. K.; WITTEN, P. E. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 1, p. 176–190, 2006.

GRUBER, R. Osteoimmunology: Inflammatory osteolysis and regeneration of the alveolar bone. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 46, n. S21, p. 52–69, 2019.

HALLÉ;N, O. et al. Preformed autologous ossicles experimental studies. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 82, n. 1–6, p. 394–401, 1976.

HARADA, S. I.; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 349–355, 2003.

HE, X. et al. Review of Antibacterial Activity of Titanium-Based Implants' Surfaces Fabricated by Micro-Arc Oxidation. **Coatings**, v. 7, n. 3, p. 45, 2017.

HEITZER, M., KNIHA, K., KATZ, M. S., WINNAND, P., PETERS, F., MÖHLHENRICH, S. C., ... & MODABBER, A. (2022). The primary stability of two dental implant systems in low-density bone. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**.

HERNÁNDEZ-CORTÉS, P. et al. An ex vivo model in human femoral heads for histopathological study and resonance frequency analysis of dental implant primary stability. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

HOEBERTZ, A.; ARNETT, T. R.; BURNSTOCK, G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 6, p. 290–297, 2003.

J. A. BUCKWALTER, M. J. GLIMCHER, R. R. COOPER, R. R. Part by. **Instructional Course Lectures**, v. 77-A, n. 1, p. 1256–1275, 1995.

J., C. L.; H., C.; J.E., F. Osteoimmunology - The hidden immune regulation of bone. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, n. 3, p. 250–255, 2009.

KARSENTY, G. UPDATE on the BIOLOGY of OSTEOCALCIN. **Endocrine Practice**, v. 23, n. 10, p. 1270–1274, 2017.

KASSOLIS, J. D.; REYNOLDS, M. A. Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 2, p. 280–287, 2005.

KIM, H. D. et al. Biomimetic materials and fabrication approaches for bone tissue engineering. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 23, p. 1–18, 2017.

KITTUR, N., OAK, R., DEKATE, D., JADHAV, S., & DHATRAK, P. (2021). Dental

implant stability and its measurements to improve osseointegration at the bone-implant interface: A review. **Materials Today: Proceedings**, 43, 1064-1070.

KUROMOTO, N. K.; SIMÃO, R. A.; SOARES, G. A. Titanium oxide films produced on commercially pure titanium by anodic oxidation with different voltages. **Materials Characterization**, v. 58, n. 2, p. 114–121, 2007.

LANDOLT, D.; MISCHLER, S.; STEMP, M. Electrochemical methods in tribocorrosion: A critical appraisal. **Electrochimica Acta**, v. 46, n. 24–25, p. 3913–3929, 2001.

LAURINDO, C. A. H. et al. Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density. **Materials Science and Engineering C**, v. 37, n. 1, p. 223–231, 2014.

LEE, H. J. et al. Microgrooves on titanium surface affect peri-implant cell adhesion and soft tissue sealing; An in vitro and in vivo study. **Journal of Periodontal and Implant Science**, v. 45, n. 3, p. 120–126, 2015.

LI, X. et al. Evaluating the osteoimmunomodulatory properties of micro-arc oxidized titanium surface at two different biological stages using an optimized in vitro cell culture strategy. [s.l.] **Elsevier B.V**, 2020a. v. 110

LI, X. et al. Reduced inflammatory response by incorporating magnesium into porous TiO₂ coating on titanium substrate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 276–284, 2018.

LI, Y. et al. Characterization and cytocompatibility of hierarchical porous TiO₂ coatings incorporated with calcium and strontium by one-step micro-arc oxidation. **Materials Science and Engineering C**, v. 109, p. 110610, 2020b.

LIU, C. et al. A strontium-modified titanium surface produced by a new method and its biocompatibility in vitro. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 2015.

LOPES, D. et al. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. **Biomaterials**, v. 185, p. 240–275, 2018a.

LOPES, D. et al. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. **Biomaterials**, v. 185, n. April, p. 240–275, 2018b.

MARIE PJ, FELSEMBERG D, BRANDI ML. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. **Osteoporos Int** 2011; 22:1659–67. [https://doi.org/ 10.1007/s00198-010-1369-0](https://doi.org/10.1007/s00198-010-1369-0).

MARX, D. et al. A review of the latest insights into the mechanism of action of strontium in bone. **Bone Reports**, v. 12, n. February, p. 100273, 2020.

MATHEW, M. T. et al. Influence of pH on the tribocorrosion behavior of CpTi in the oral environment: Synergistic interactions of wear and corrosion. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 100 B, n. 6, p. 1662–1671, 2012.

MATHEW, M. T. et al. Tribocorrosion behaviour of TiCxOy thin films in bio-fluids. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 2, p. 929–937, 2010.

MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast-osteoblast communication. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 201–209, 2008.

MIYAMOTO, T. The dendritic cell-specific transmembrane protein DC-STAMP is essential for osteoclast fusion and osteoclast bone-resorbing activity. **Modern Rheumatology**, v. 16, n. 6, p. 341–342, 2006.

MONJE, A. et al. (LI et al., 2020b; SEDELNIKOVA et al., 2019), 2020b; SEDELNIKOVA et al., 2019). **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 11, p. 1231–1248, 2015.

MOSEKE C, WIMMER K, MEININGER M, ZERWECK J, WOLF-BRANDSTETTER C, GBURECK U, EWALD A. Osteoclast and osteoblast response to strontium-doped struvite coatings on titanium for improved bone integration. **Biomed Tech** (Berl). 2020 Oct 25;65(5):631-641. doi: 10.1515/bmt-2019-0265. PMID: 32452822.

OLIVEIRA, F. G. et al. Understanding growth mechanisms and tribocorrosion behaviour of porous TiO₂ anodic films containing calcium, phosphorous and magnesium. **Applied Surface Science**, v. 341, n. 2015, p. 1–12, 2015.

ONO, T.; NAKASHIMA, T. Recent advances in osteoclast biology. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 325–341, 2018.

OWEN, R.; REILLY, G. C. In vitro models of bone remodelling and associated disorders. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. OCT, 2018.

PELLEGRINI, G. et al. Novel surfaces and osseointegration in implant dentistry. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 9, n. 4, p. e12349, 2018.

R. SILVA, G. SASSO, E. SASSO-CERRI, M. SIMÕES, P. C. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and factors That Influence Bone Cells. **Biomed Research International**, v. 7, n. 6, p. 17–24, 2015.

RAMAESH, T.; BARD, J. B. L. The growth and morphogenesis of the early mouse mandible: A quantitative analysis. **Journal of Anatomy**, v. 203, n. 2, p. 213–222, 2003.

]

RATNAYAKE, J. T. B.; MUCALO, M.; DIAS, G. J. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 105, n. 5, p. 1285–1299, 2017.

RIBEIRO, A. R. et al. Micro-arc oxidation as a tool to develop multifunctional calcium-rich surfaces for dental implant applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 54, p. 196–206, 2015.

ROCHEFORT, G. Y.; PALLU, S.; BENHAMOU, C. L. Osteocyte: The unrecognized side of bone tissue. **Osteoporosis International**, v. 21, n. 9, p. 1457–1469, 2010.

SAKAI, A. et al. Preparation of Sr-containing carbonate apatite as a bone substitute and its properties. **Dental Materials Journal**, v. 31, n. 2, p. 197–205, 2012.

SARAN, U.; GEMINI PIPERNI, S.; CHATTERJEE, S. Role of angiogenesis in bone repair. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 109–117, 2014.

SATO, M. et al. Effect of strontium ions on calcification of preosteoblasts cultured on porous calcium-and phosphate-containing titanium oxide layers formed by micro-arc oxidation. **Dental Materials Journal**, v. 35, n. 4, p. 627–634, 2016.

SCARDUELI, C. R. et al. Systemic administration of strontium ranelate to enhance the osseointegration of implants: systematic review of animal studies. **International Journal of Implant Dentistry**, v. 4, n. 1, 2018.

SEDELNIKOVA, M. B. et al. Modification of titanium surface via Ag-, Sr- and Si-containing micro-arc calcium phosphate coating. **Bioactive Materials**, v. 4, n. May, p. 224–235, 2019.

SHEN, X., FANG, K., YIE, K. H. R., ZHOU, Z., SHEN, Y., WU, S., ... & LIU, J. (2022). High proportion strontium-doped micro-arc oxidation coatings enhance early osseointegration of titanium in osteoporosis by anti-oxidative stress pathway. **Bioactive materials**, 10, 405-419.

SLOT, W. et al. A systematic review of implant-supported maxillary overdentures after a mean observation period of at least 1 year: Review Article. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, n. 1, p. 98–110, 2010.

SURMENEV, R. A.; SURMENEVA, M. A.; IVANOVA, A. A. Significance of calcium

phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis - A review. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 557–579, 2014.

TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 4, p. 292–304, 2007.

TAMMA, R.; ZALLONE, A. Osteoblast and osteoclast crosstalks: From OAF to Ephrin. **Inflammation and Allergy - Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 196–200, 2012.

TAO ZS, BAI BL, HE XW, LIU W, LI H, ZHOU Q, SUN T, HUANG ZL, TU KK, LV YX, CUI W, YANG L. A comparative study of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant's osseointegration for osteopenic rats. **Med Biol Eng Comput**. 2016 Dec;54(12):1959-1968. doi: 10.1007/s11517-016-1494-9. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27099156.

ULM, C. et al. Characteristic features of trabecular bone in edentulous mandibles. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. 6, p. 594–600, 2009.

WALSH, F. C. et al. Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al, mg, Ti) alloys. **Transactions of the Institute of Metal Finishing**, v. 87, n. 3, p. 122–135, 2009.

WALSH, M. C.; CHOI, Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–12, 2014.

WANG H, XU Q, HU H, SHI C, LIN Z, JIANG H, DONG H, GUO J. The Fabrication and Function of Strontium-modified Hierarchical Micro/Nano Titanium Implant. **Int J Nanomedicine**. 2020 Nov 16;15:8983-8998. doi: 10.2147/IJN.S268657. PMID: 33239873; PMCID: PMC7682802.

YAMAHA, T. et al. Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells.

Journal of Dental Research, v. 90, n. 3, p. 317–324, 2011.

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

YUAN, X. et al. Immunomodulatory effects of calcium and strontium co-doped titanium oxides on osteogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, p. 6–9, 2017.

9. ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer circunstanciado do Comitê de  tica e Pesquisa

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DOS BIOMATERIAIS NA INTERA O COM CÉLULAS HUMANAS DE OSSO E PELE

Pesquisador: Sara Gemini Piperni

 rea Temática:

Versão: 5

CAAE: 16124819.6.0000.5283

Institui o Proponente: ASSOCIACAO FLUMINENSE DE EDUCACAO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.615.152

Apresenta o do Projeto:

O presente projeto visa avaliar a intera o de superf cias ou partículas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada sintetizada em várias temperaturas, dióxido de titânio e L-PRF (Plasma Rico em Fibrina e leucócitos), com células de pele e osteoblastos em termos de citotoxicidade, diferencia o e produ o de matriz extracelular com o intuito de aprimorar o uso destes biomateriais destinados   prática clínica. As células serão obtidas de cultura primária de material de biópsia coletada durante procedimento odontológico de rotina.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a intera o de superf cias ou partículas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada sintetizada em várias temperaturas, dióxido de titânio e L-PRF, com células de pele e osteoblastos em termos de citotoxicidade, diferencia o e produ o de matriz extracelular com o intuito de aprimorar o uso destes biomateriais destinados   prática clínica.

Avalia o dos Riscos e Benefícios:

Os possíveis riscos são provindos da cirurgia que será realizada mediante o implante dentário, como: infec o, sangramento e dor pós-cirurgia. Entretanto, os cuidados devidos serão tomados para que isso não aconteça. Os benefícios são: Melhorar e contribuir para aplica o de biomateriais (superf cias ou materiais anoestruturados) na terapia de câncer, doença cardiovascular, ortopedia e odontologia, doenças

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: cep@unigranrio.com.br

infeciosas, gastroenterologia, imunologia, neurologia, além de preenchedor, cosméticos e fotoprotetores.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto importante para o desenvolvimento de novos biomateriais, assim como, do entendimento de sua ação na interação com células e tecidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão de acordo com a resolução 466/2012.

Recomendações:

O projeto foi ressubmetido, pois na submissão anterior, não constavam as cartas de anuência dos locais onde o material seria coletado. Sendo este problema sanado na atual submissão.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_194642_0_E3.pdf	05/08/2022 18:56:10		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP_Emenda.pdf	11/05/2022 10:57:30	Sara Gemini Piperni	Aceito
Outros	Ementa2.pdf	15/12/2020 12:22:16	Sara Gemini Piperni	Aceito
Outros	Ementa.pdf	28/10/2019 16:33:46	Sara Gemini Piperni	Aceito
Cronograma	cronograma_atualizado_Sara.pdf	14/08/2019 09:41:38	Renato Cerqueira Zambrotti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_atualizado_Sara.pdf	14/08/2019 09:41:14	Renato Cerqueira Zambrotti	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	12/06/2019 18:16:29	Sara Gemini Piperni	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_Funadesp_Sara_Gemini_Piperni.pdf	12/06/2019 18:09:39	Sara Gemini Piperni	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_clinica.pdf	11/06/2019 08:53:10	Sara Gemini Piperni	Aceito

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 5.615.152

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia.pdf	11/06/2019 08:52:48	Sara Gemini Piperni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	10/06/2019 12:52:18	Sara Gemini Piperni	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	17/05/2019 08:14:17	Sara Gemini Piperni	Aceito
Orçamento	Orcamento_de_Projeto_2019_para_CE P.pdf	14/05/2019 14:41:23	Sara Gemini Piperni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_UNIGRANRIO.pdf	14/05/2019 14:31:02	Sara Gemini Piperni	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DUQUE DE CAXIAS, 30 de Agosto de 2022

Assinado por:
SERGIAN VIANNA CARDOZO
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: cep@unigranrio.com.br

ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta de sangue



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“Influência das características dos biomateriais na interação com células humanas de osso e pele”**. Você foi selecionado por ordem de atendimento e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição Unigranrio. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a qualidade do material desenvolvido como substituto biológico de um tecido humano danificado, ao fim de compreender como melhorar a qualidade do próprio material para avaliação de melhor custo/benefício para o paciente. Em nossa pesquisa, utilizaremos sangue de doadores voluntários e/ou tecido ósseo e/ou pele que seria descartado após a cirurgia (durante seu tratamento convencional), para investigar a qualidade e a segurança de novos biomateriais. As células, que serão retiradas de suas amostras, serão utilizadas em diversos ensaios da biotecnologia, a fim de comprovar a segurança e os benefícios de biomateriais, podendo trazer diversos benefícios para a população.

Os riscos relacionados com sua participação são pequenos, porque todos os procedimentos realizados são rotineiros e seguem rigorosamente os protocolos de biossegurança. Ou seja, utilizamos materiais descartáveis e instrumentais esterilizados. Os benefícios relacionados com a sua participação são contribuição para estudos que ajudem a compreender o efeito dos biomateriais sobre as células da pele e do osso.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Todas as amostras coletadas serão codificadas e os pesquisadores manterão sigilo sobre seus dados pessoais.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com a pesquisadora responsável Sara Gemini Piperni (e-mail: sara.gemini@hotmail.com, telefone: 21-26727776).

Pesquisador Responsável

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na R. Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733, ENDEREÇO ELETRÔNICO: cep@unigranrio.com.br.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20 ____.

Sujeito da pesquisa

Pai / Mãe ou Responsável Legal