

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
PROGRAMA DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO
NA MINERALIZAÇÃO ÓSSEA: UMA COMPARAÇÃO ENTRE
MODELOS DE OSTEÓBLASTOS 2D E 3D**

GABRIELA DE SOUZA CASTRO

2023

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NA MINERALIZAÇÃO ÓSSEA: UMA COMPARAÇÃO ENTRE MODELOS DE OSTEOLASTOS 2D E 3D

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

Banca examinadora

Prof. Dr. Victor Talarico

Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO/AFYA

Prof. Dr. Wanderson de Souza

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO

Orientadora: Prof^a Dr^a Sara Gemini-Piperni

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

FICHA CATALOGRÁFICA

AGRADECIMENTOS

Obrigada, Deus, por me manter forte e obstinada nessa etapa tão importante.

Obrigada, meu pai Jorge Aloisio, minha mãe Maria Emilia e minha família, por me incentivarem nos estudos e a iniciar o mestrado.

Obrigada, meus amigos Júlia Reis, Bruna Gontijo, João Marcos Rocha e Patrick Cruz, por sempre me fazerem sentir especial e capaz e pelos momentos de descontração, tão importantes nesse processo.

Obrigada, meu namorado e melhor amigo Lucas Fontam, por me apoiar, ouvir, acolher, fortalecer, por tornar tudo mais leve e sempre acreditar no meu potencial.

Obrigada, minha orientadora Sara Gemini-Piperni e meu colega de pesquisa Wanderson de Souza, por serem minhas referências na ciência, me dando suporte e me mantendo persistente na caminhada por essa conquista.

RESUMO

Objetivo: Este estudo tem como objetivo comparar a diferenciação e a produção de matriz mineralizada em osteoblastos humanos SAOS-2, tanto em culturas em monocamada quanto em modelos 3D, após exposição a diferentes concentrações de NPs de TiO_2 . **Materiais e métodos:** As nanopartículas foram minuciosamente caracterizadas, e sua internalização e os efeitos sobre as células SAOS-2 em monocamada e em esferóides 3D foram avaliados por meio de análise morfológica. A mineralização dos osteoblastos humanos após a exposição às NPs de TiO_2 foi determinada utilizando a técnica de coloração com vermelho de alizarina. **Resultados:** Revelou-se um aumento na formação da matriz mineralizada, dependente da dose, tanto em osteoblastos primários humanos quanto em SAOS-2, nos modelos em monocamada e em 3D. Além disso, nossos resultados evidenciam que, após uma exposição intensa às NPs de TiO_2 , o aumento dependente da dose na formação da matriz mineralizada óssea é mais pronunciado no modelo de células 3D do que na cultura 2D. **Conclusão:** Os resultados indicam que o modelo 3D apresenta um potencial promissor para avaliar os efeitos na osteointegração.

Palavras-chave: TiO_2 NPs; implantes dentários de titânio; esferóides 3D; osteoblastos.

ABSTRACT

Objective: This study aims to compare the differentiation and production of mineralized matrix in human osteoblasts SAOS-2, both in monolayer cultures and in 3D models, after exposure to different concentrations of TiO₂ NPs. **Materials and methods:** The nanoparticles were thoroughly characterized, and their internalization and effects on SAOS-2 cells in monolayer and 3D spheroids were evaluated through morphological analysis. The mineralization of human osteoblasts following exposure to TiO₂ NPs was determined using the alizarin red staining technique. **Results:** An increase in mineralized matrix formation, dose-dependent, was observed in both primary human osteoblasts and SAOS-2, in both monolayer and 3D models. Furthermore, our results demonstrate that after intense exposure to TiO₂ NPs, the dose-dependent increase in bone mineralized matrix formation is more pronounced in the 3D cell model than in the 2D culture. **Conclusion:** The results indicate that the 3D model shows promising potential for assessing effects on osteointegration.

Keywords: TiO₂ NPs; titanium dental implants; 3D spheroids; osteoblasts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura 1: Ilustração da unidade funcional do osso, o osteón.	3
Figura 2: Diferença entre a organização das fibras colágenas em osso lamelar e não lamelar.	4
Figura 3: Arranjo das fibras de colágeno. Na 3A: Arranjo das fibras colágenas em diferentes direções no espaço. Na 3B o arranjo das fibras colágenas em lamelas.	5
Figura 4: Tipos de células ósseas.	6
Figura 5: Processo de maturação da célula mesenquimal até se tornar um osteoblasto maduro e, em seguida, um osteócito.	7
Figura 6: Imagem ilustrativa da diferença entre um modelo celular em monocamada (2D) e um esferóide (3D).	111
Figura 7: Caracterização das NPs de TiO ₂	222
Figura 8: Tratamento das NPs de TiO ₂ em culturas 2D e 3D de osteoblastos humanos (SAOS-2).	233
Figura 9: Morfologia de osteoblastos humanos (SAOS-2) cultivados em 2D e 3D após exposição às NPs de TiO ₂	244
Figura 10: Viabilidade de osteoblastos humanos em 2D e 3D (SAOS-2): SAOS-2 foram expostos às NPs de TiO ₂	255
Figura 11: Internalização de NPs de TiO ₂	266
Figura 12: Diferenciação e mineralização de osteoblastos primários.	277
Figura 13: Matriz mineralizada produzida por osteoblastos humanos (SAOS-2) em células 2D e 3D expostas a NPs de TiO ₂ (0, 5 e 100 µg/mL) durante 3 e 14 dias em meio osteogênico.	288
Figura 14: Esquema de diferenciação e produção de matriz mineralizada de osteoblastos humanos SAOS-2 cultivados em monocamada e modelos de células esféricas 3D após exposição ao TiO ₂	311

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades gerais do titânio.	9
--	---

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Tecido ósseo	1
1.1.1 Osteoblastos	7
1.2 Titânio na Implantodontia	8
1.3 Modelos de estudo in vitro 2D e 3D	10
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVO	15
3.1 Objetivos específicos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Dispersão de anatase de titânio.....	16
4.2 Cultura de células	16
4.3 Cultura 3D	17
4.4 Citoesqueleto celular 3D	17
4.5 Exposição às NPs	17
4.6 Ensaio de citotoxicidade	18
4.7 Análise de morfologia	18
4.8 Diferenciação e análise da matriz celular	19
4.9 Análise estatística	19
5. RESULTADOS	21
5.1 Caracterização das NPs de TiO ₂	21
5.2 Efeito das NPs de TiO ₂ na Morfologia de Osteoblastos Humanos 2D e 3D	22
5.3 Efeito das NPs de TiO ₂ na Viabilidade de Osteoblastos Humanos	24

5.4 Internalização das NPs de TiO ₂ em Culturas de Osteoblastos Humanos 2D e 3D.....	255
5.5 Diferenciação e Mineralização de Osteoblastos Humanos após a Exposição a NPs de TiO ₂	277
6. DISCUSSÃO	299
7. CONCLUSÃO	366
8. REFERENCIAS.....	377
ARTIGO PUBLICADO (em anexo)	422

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente especializado e mineralizado, cuja natureza dinâmica contrasta com sua aparência aparentemente estática. Apesar dessa aparência, os ossos estão constantemente passando por processos de remodelação, desempenhando funções vitais no corpo, como sustentação, proteção de órgãos vitais e tecidos moles, além de servir como reserva para minerais como cálcio e fosfato, e como local para a produção de células sanguíneas na medula óssea (FLORENCIO et al., 2015)

Este tecido exerce uma série de funções cruciais no organismo. Além de prover estrutura para a locomoção e oferecer suporte e proteção a outras partes do corpo, também funciona como um reservatório para armazenamento de minerais essenciais, como o cálcio e o fósforo (BUCKWALTER et al., 1996; DOWNEY & SIEGEL, 2006; DATTA et al., 2008). Além de suas funções estruturais, o tecido ósseo também possui funções endócrinas, uma vez que produz o hormônio osteocalcina. Além disso, está implicado no processo de audição, sendo um meio pelo qual o corpo detecta potenciais ameaças. Estudos têm sugerido que tanto as funções clássicas quanto as endócrinas do osso podem contribuir para a resposta de fuga do organismo. Essa interpretação abre a possibilidade de que o osso regule outras respostas fisiológicas em situações de perigo (BERGER et al., 2019).

Quanto à sua forma, os ossos se classificam principalmente em três categorias: chatos, longos e curtos. A formação desses ossos segue um processo chamado ossificação endocondral, em que uma placa de cartilagem hialina gradualmente se transforma em tecido ósseo. Os ossos longos apresentam uma estrutura distinta, composta pela diáfise, que é a porção central que conecta as extremidades, conhecidas como epífises. A diáfise é revestida por osso compacto, enquanto as epífises, em sua maioria, são compostas por osso esponjoso e cobertas por uma fina camada de osso compacto. A cavidade medular encontra-se na diáfise e contém a medula óssea. A metáfise é a região

situada no colo do osso, onde a diáfise encontra as epífises. É um local crucial para o crescimento ósseo, onde ocorrem as principais mudanças durante o desenvolvimento. Por outro lado, os ossos curtos têm um formato aproximadamente cúbico, com uma fina camada externa de osso compacto que envolve o osso trabecular e a medula óssea. Sua função principal é proporcionar estabilidade e permitir algum grau de movimento nas articulações. Os ossos chatos, por sua vez, são caracterizados por duas camadas de osso compacto que cobrem o osso esponjoso e a medula óssea. Eles são especialmente importantes na proteção de órgãos vitais, como o cérebro, o coração e os órgãos pélvicos. Além disso, devido à sua forma plana, os ossos chatos oferecem áreas extensas para a fixação de músculos. Um exemplo notável é o crânio, que inclui ossos como a mandíbula e a maxila. Essa diversidade na estrutura dos ossos reflete suas funções específicas no corpo humano, que vão desde o suporte e mobilidade até a proteção de órgãos vitais e pontos de ancoragem para a musculatura (MOORE et al., 2013; CHUNG et al., 2017).

Quanto à densidade, o osso pode ser dividido em dois tipos principais: osso compacto e osso trabecular (também conhecido como osso esponjoso). Esses dois tipos de tecido ósseo têm estruturas diferentes e desempenham funções específicas no corpo. O osso compacto é a forma mais densa e resistente do tecido ósseo. Ele compreende a parte externa dos ossos longos e a camada externa dos ossos planos. A principal função do osso compacto é proporcionar resistência e suporte mecânico aos ossos, ajudando-os a suportar o peso e a resistir a forças mecânicas. Sua estrutura é composta por unidades microscópicas chamadas osteóns, que são organizadas em sistemas concêntricos, formando o que é conhecido como sistema de Havers. Este tipo de osso é rico em minerais, como cálcio e fósforo, que tornam o osso duro e resistente. O interior de cada sistema ósseo contém um canal central chamado de canal de Havers, por onde passam vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, garantindo a vitalidade e a comunicação dentro do tecido. Os vasos sanguíneos que cruzam a diáfise em direção transversal são conhecidos como canais de Volkmann. Eles se originam a partir de vasos localizados no canal medular (conforme representado à direita na figura) ou, em casos menos comuns, do periósteo. A principal função desses canais de Volkmann é estabelecer conexões entre os canais de Havers vizinhos. Os vasos sanguíneos encontrados nos canais de Havers internos desempenham

um papel essencial ao permitir que a circulação sanguínea e linfática percorra todo o sistema de Havers longitudinalmente (Figura 1) Além disso, esses vasos são responsáveis por nutrir os osteócitos presentes em cada ósteon, garantindo a saúde e a funcionalidade das células ósseas. Já o osso trabecular, também chamado de osso esponjoso, é uma estrutura menos densa e mais porosa em comparação com o osso compacto. Ele está localizado nas extremidades dos ossos longos, dentro das epífises, e constitui a maior parte do interior de ossos planos. Este tipo de osso é composto por uma rede de pequenas placas ósseas interconectadas, chamadas trabéculas. Essas trabéculas formam espaços preenchidos por medula óssea vermelha, onde ocorre a produção de células sanguíneas. Ele também oferece resistência mecânica, embora seja menos denso que o osso compacto. Em resumo, o osso compacto é mais denso e resistente, formando a camada externa dos ossos, enquanto o osso trabecular é menos denso e mais poroso, encontrado nas extremidades dos ossos e no interior dos ossos planos (JUNQUEIRA et al., 2017, PEREIRA et al., 2019).

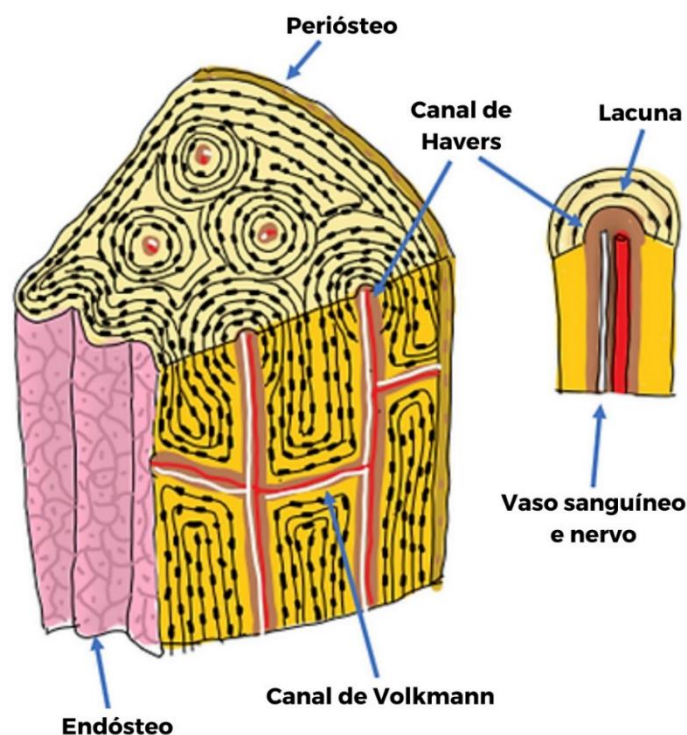


Figura 1: Ilustração da unidade funcional do osso, o osteón. As lamelas ósseas são dispostas em volta do canal de Havers, longitudinal, onde passam os vasos e nervos. Os canais de Havers são conectados entre si por canais transversais, chamados de canais de Volkmann. Os osteoblastos presos na matriz extracelular se transformam em osteócitos, mecanossensores visíveis nas lamelas óssea.

Fonte: <https://www.histologiauem.pt/tecido-osseo>

Outra generalidade do tecido ósseo o divide entre osso lamelar/maduro e não lamelar/imaturo (Figura 2). O osso em sua forma imatura é sempre o primeiro a se desenvolver, seja durante o período fetal, durante processos de remodelação óssea ao longo da vida ou durante a consolidação de fraturas. Em adultos, esse tipo de osso é encontrado apenas em algumas regiões específicas do corpo, como os alvéolos dentários. À medida que o osso maduro gradualmente substitui o osso imaturo, o tipo predominante nos adultos se estabelece. As principais diferenças histológicas entre esses dois tipos de osso são que a matriz do osso não lamelar é caracterizada pela disposição das fibras colágenas em muitas direções, sem qualquer organização específica, o que resulta em uma estrutura menos organizada e mais aleatória (Figura 3A); já o osso lamelar apresenta uma organização muito mais estruturada, onde as fibras colágenas na matriz óssea são organizadas em finas lâminas conhecidas como lamelas ósseas e dentro de cada lamela, as fibras colágenas são dispostas paralelamente entre si, proporcionando uma organização mais ordenada (Figura 3B). Essas diferenças na organização das fibras colágenas são fundamentais para as propriedades físicas e funcionais do osso, tornando o osso maduro mais adaptado às demandas de sustentação, movimento e proteção que o corpo adulto requer (PEREIRA et al., 2019; PAWLINA, 2016; VIGUET-CARRIN et al., 2006).

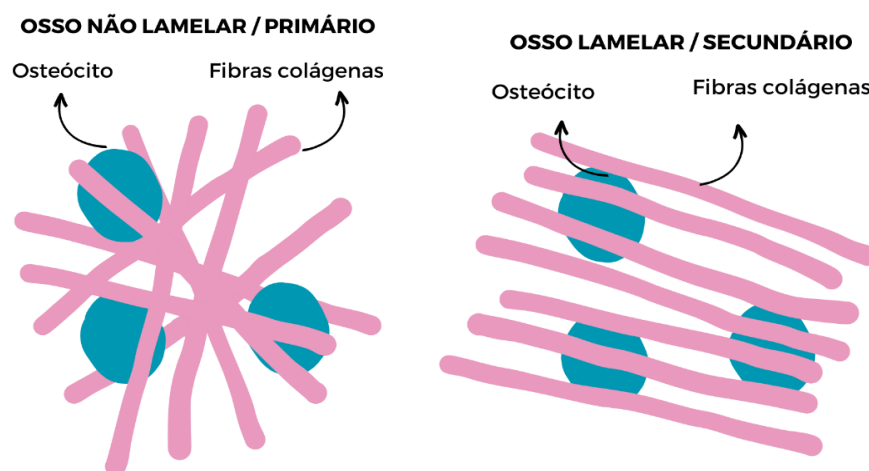
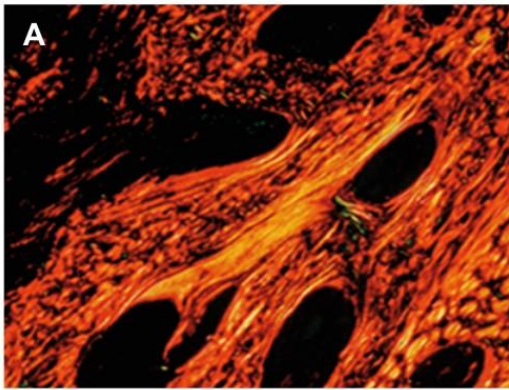


Figura 2: Diferença entre a organização das fibras colágenas em osso lamelar e não lamelar. No osso não lamelar as fibras se apresentam de forma mais desorganizadas enquanto no osso lamelar se organizam segundo direções específicas.

Fonte: Imagem autoral

Tecido Ósseo Imaturo



Tecido Ósseo Maduro

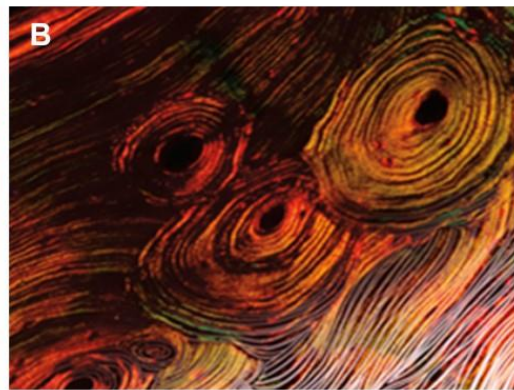


Figura 3: Arranjo das fibras de colágeno. Na 3A: Arranjo das fibras colágenas em diferentes direções no espaço. Na 3B o arranjo das fibras colágenas em lamelas.
Fonte: PEREIRA et al., 2019.

Similar a outros tipos de tecido conjuntivo, o tecido ósseo é formado por células especializadas e uma matriz extracelular. Essa matriz é composta por componentes orgânicos e inorgânicos, sendo esta estrutura fundamental para conferir as propriedades de resistência e rigidez necessárias para suportar impactos e manter a integridade do tecido ósseo (NORDIN & FRANKEL, 2001).

A parte inorgânica do tecido ósseo se manifesta na forma de sais minerais, incluindo hidroxiapatita fosfatada e carbonatada. A mineralização do tecido duro, presente tanto nos ossos como nos dentes, é composta pela hidroxiapatita, uma forma cristalina do fosfato de cálcio ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). A fragilidade dessa estrutura cristalina é superada pela associação com as fibras colágenas, o que confere ao tecido ósseo uma combinação de rigidez e resistência necessárias para suportar tensões mecânica (KIERSENBAUM & TRES, 2012; COOPER, 2000).

O componente orgânico predominante da matriz óssea é o colágeno, especialmente o colágeno tipo I, que forma estruturas fibrilares originadas a partir da microfibrila. A formação das microfibrilas começa com as interações entre moléculas de tropocolágeno. As ligações cruzadas de colágeno, juntamente com pequenas quantidades de outras proteínas, contribuem para a resistência à tração e a elasticidade do tecido. A extensão e o tipo de ligação cruzada estão relacionados à idade e função do tecido, com a tensão nas fibras colágenas influenciando diretamente a formação dessas ligações e, por consequência, as

propriedades mecânicas do tecido. Essas propriedades viscoelásticas são vitais para a integridade e funcionalidade do tecido ósso. Além disso, a matriz contém proteínas não colágenas como osteocalcina, osteonectina, osteopontina, entre outras, que desempenham papéis fundamentais na regulação da função óssea (LODISH et al., 2000; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

O tecido ósseo abriga quatro principais tipos de células: células osteoprogenitoras, osteócitos, osteoblastos e osteoclastos (Figura 4). As osteoprogenitoras são células com potencial para diferenciar-se em osteoblastos, que são responsáveis pela formação do tecido ósseo. Os osteócitos são células que estabelecem conexões entre si através de prolongamentos, permitindo a passagem de moléculas e íons e desempenhando um papel crucial na manutenção da matriz óssea. Os osteoblastos, células metabolicamente ativas, têm a tarefa de produzir novo tecido ósseo. Por outro lado, os osteoclastos são células de grandes dimensões formadas pela fusão de células do sistema fagocitário mononuclear e estão envolvidos na reabsorção óssea (ANDIA et al., 2006; COSTA E SILVA & MEI, 2010).

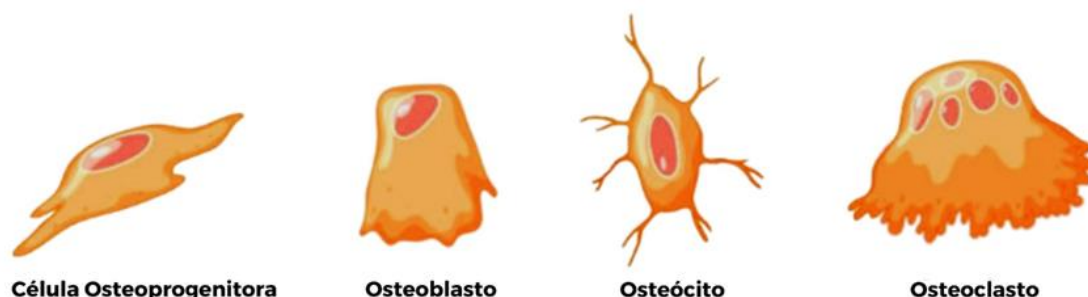


Figura 4: Tipos de células ósseas. As células progenitoras se diferenciam em osteoblastos, responsáveis pela deposição do tecido ósseo. Quando as células ficam presas na matriz extracelular que elas mesmas produzem, sofrem uma diferenciação em osteócitos, mecanossensores que percebem as mudanças do tecido ósseo. Os osteoclastos são células multinucleadas que reabsorvem o osso. Este equilíbrio e manutenção constante do tecido confere a sua resistência aos impactos.

Fonte: TORMENA et al., 2009.

Em síntese, o tecido ósseo é um componente complexo e dinâmico do organismo humano, cujas propriedades estruturais, funcionais e bioquímicas o tornam crucial para diversas funções vitais, desde o suporte estrutural até a regulação endócrina e resposta a situações de perigo (FLORENCIO et al., 2015). Seu papel multifacetado reflete-se nas variadas células e componentes

presentes em sua composição, bem como nas complexas interações entre suas partes orgânicas e inorgânicas (BUCKWALTER et al, 1996; DOWNEY, SIEGEL, 2006; DATTA et al., 2008).

1.1.1 Osteoblastos

Os osteoblastos, células que apresentam uma morfologia cúbica ou cilíndrica com características epiteliais, formam uma fina camada que cobre todas as regiões ativas onde o osso está sendo formado. Originados a partir de células mesenquimais pluripotentes, os osteoblastos desempenham um papel crucial na osteogênese, que envolve a síntese e a secreção da matriz orgânica do osso, bem como o armazenamento de minerais e o revestimento da maioria das superfícies ósseas. Um aspecto fundamental é que esses osteoblastos são responsáveis por iniciar e regular a subsequente mineralização do osteóide, a substância pré-mineralizada da matriz óssea (ANDIA et al., 2006; COSTA E SILVA, MEI, 2010).

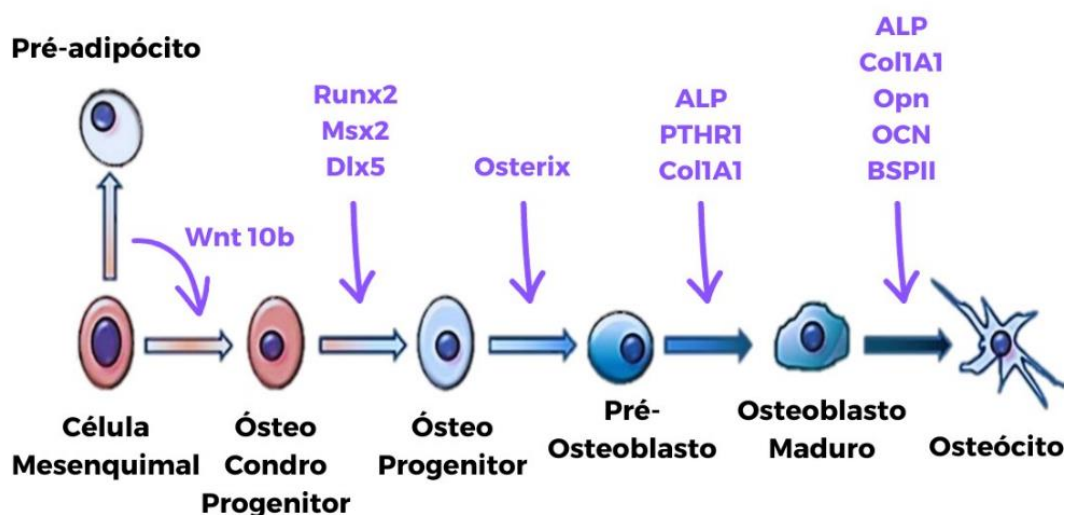


Figura 5: Processo de maturação da célula mesenquimal até se tornar um osteoblasto maduro e, em seguida, um osteócito. A via de sinalização do Wnt garante a ativação da diferenciação da célula mesenquimal em uma linhagem osteoprogenitora. A expressão de Runx2 promove a diferenciação em osteoblastos. Conforme os osteoblastos amadurecem eles expressam genes necessários para deposição da matriz extracelular mineralizada, como fosfatase alcalina (ALP), colágeno 1, entre outros. Por fim, estas células se diferenciam em osteócitos, uma vez que ficam presos na própria matriz.

Fonte: Sara Gemini-Piperni.

Análises em eletromicrografias revelam que os osteoblastos apresentam as características típicas de células altamente envolvidas na produção, glicosilação e liberação de proteínas. Durante a fase ativa, essas células tendem a aumentar em tamanho e o núcleo migra para a extremidade distante da superfície óssea. À medida que a matriz se solidifica, os osteoblastos amadurecem e eventualmente se transformam em osteócitos (ANDIA et al., 2006).

O processo de formação óssea é complexo e ocorre em três estágios principais. Inicialmente, há uma etapa de proliferação, na qual o número de pré-osteoblastos aumenta. Na etapa seguinte, chamada de diferenciação, os pré-osteoblastos se transformam em osteoblastos maduros. Por fim, ocorre a mineralização da matriz, na qual os osteoblastos maduros trabalham para criar a nova matriz óssea (COSTA E SILVA, MEI, 2010).

A remodelação óssea é um processo que se inicia com a ativação dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea. À medida que a reabsorção avança, novos precursores de osteoclastos são recrutados. Quando a reabsorção é interrompida, os osteoblastos entram em ação, revertendo o processo e iniciando a secreção do osteóide. Esse osteóide é a porção orgânica da matriz, não mineralizada. Conforme os osteoblastos depositam mais tecido ósseo, eles eventualmente se tornam osteócitos e ficam incorporados na matriz mineralizada (COSTA E SILVA, MEI, 2010).

A qualidade do tecido ósseo é de extrema importância na área da Odontologia, abrangendo diversas especialidades. O osso é a base de sustentação para os dentes e desempenha um papel crucial na Implantodontia, onde implantes dentários são fixados diretamente na mandíbula e na maxila. Compreender como as células ósseas reagem ao contato com implantes, tanto em termos estruturais quanto em nível nanométrico, é de interesse crescente. A produção adequada de matriz óssea mineralizada ao redor dos implantes é fundamental para o sucesso do procedimento.

1.2 Titânio na Implantodontia

O titânio, um metal que possui um lugar distinto como o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre, é dotado de características notáveis.

Embora seja um metal de transição tão robusto quanto alguns tipos de aço, possui apenas metade da densidade destes. Suas propriedades incluem uma densidade reduzida de 4,51 g/cm³, um elevado ponto de fusão de 1670 °C, um módulo de elasticidade (Young) de 115 GPa, uma resistência à tração de 740 MPa e um módulo de cisalhamento de 45 GPa (LONG, RACK, 1998).

Tabela 1: Propriedades gerais do titânio.

Propriedades do Titânio	
Massa atômica	47,867 u
Densidade	4,51 g/cm ³
Ponto de fusão	1668°C
Resistência mecânica à tração	Alta, entre 200 e 1370 Mpa
Resistência à corrosão	Alta
Massa atômica	47,867 u
Condutividade térmica e elétrica	Baixa
Coeficiente de expansão térmica	8,41x10 ⁻⁶ °C ⁻¹
Módulo de elasticidade	107 GPa
Biocompatibilidade	Sim

Fontes: BERGER et al., 2019; MOORE et al., 2013.

Devido à sua estrutura eletrônica que apresenta uma camada incompleta de elétrons na configuração, o titânio tem a capacidade de formar soluções sólidas com muitos elementos (LIU et al., 2004; LEMONS & MISCH, 2000; VIRTANEN et al., 2008). Sua descoberta remonta a 1790, quando o químico William Gregor analisou uma amostra de areia da região do vale de Manaccan, na Cornualha, na Inglaterra. No entanto, somente em 1795, Klaproth escolheu seu nome, homenageando os Titãs da mitologia, conhecidos por sua força excepcional como os primeiros filhos da Terra (LIU et al., 2004).

O uso de titânio e suas ligas para aplicações biomédicas é amplamente reconhecido por suas vantagens em relação a outros biomateriais metálicos. Esses materiais oferecem propriedades mecânicas que se alinham bem com as funções biológicas, além de resistência à corrosão, desgaste e biocompatibilidade superiores (GUPTA & GRANDE-ALLEN, 2006). No entanto, o titânio comercialmente puro enfrenta limitações em termos de resistência ao desgaste, tornando-se inadequado para aplicações de alta tensão, como implantes dentários (HOLLINGER, 2012).

Para superar essa limitação, o titânio tem sido a base para o desenvolvimento de ligas, como a conhecida liga Ti-6Al-4V, que inclui elementos como alumínio, vanádio e ferro. Essas ligas combinam as propriedades desejáveis do titânio com melhorias na resistência e durabilidade. Além de suas propriedades físicas e químicas mencionadas anteriormente, o titânio também apresenta uma capacidade única de formar uma camada fina de dióxido de titânio (TiO₂) em sua superfície, promovendo a passivação e reduzindo a rejeição tecidual ao redor de implantes por meio da osseointegração (HOLLINGER, 2012).

Assim, os biomateriais desempenham um papel crucial na medicina moderna, proporcionando soluções que variam desde a substituição até a regeneração de tecidos. No contexto da odontologia, em particular, o titânio e suas ligas têm demonstrado resultados notáveis, mostrando-se como materiais de escolha para implantes dentários e outros dispositivos médicos devido às suas propriedades mecânicas e biológicas excepcionais (BAELUM et al., 1997).

1.3 Modelos de estudo in vitro 2D e 3D

Por muito tempo, a pesquisa in vitro sobre mecanismos celulares e doenças confiou principalmente em culturas de células bidimensionais (2D) em placas de cultura celular dentro de ambientes controlados artificialmente. No entanto, na última década, as culturas tridimensionais (3D) de células na forma de esferoides ou organoides ganharam popularidade devido à sua maior relevância fisiológica e melhor mimetização da complexidade do tecido in vivo.

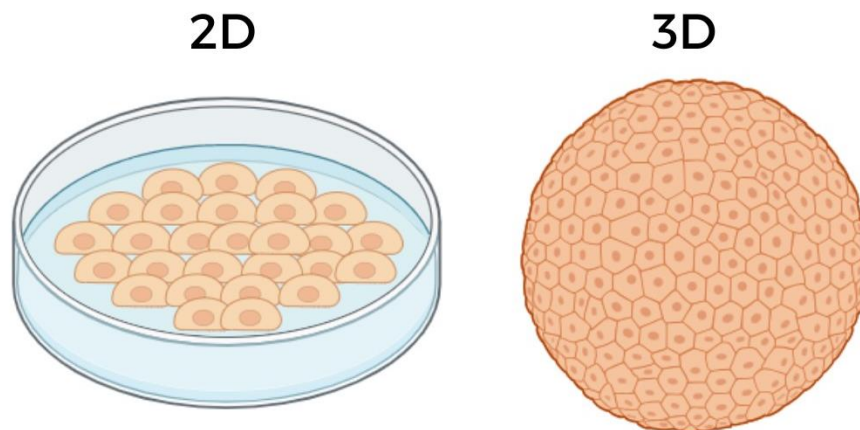


Figura 6: Imagem ilustrativa da diferença entre um modelo celular em monocamada (2D) e um esferoide (3D). Apesar das vantagens como fácil observação, manipulação e controle e a presença de muitos dados na literatura para cultivo 2D, a estrutura tridimensional não é representada por este modelo, resultando em uma dificuldade de mimetizar comportamento *in vivo*. Para este fim, a cultura celular em três dimensões que apresenta maior similaridade estrutural com tecido e órgãos, apesar da desvantagem de limitado transporte de oxigênio e catabólitos.

Fonte: Imagem autoral.

Os modelos 2D, embora sejam mais simples e econômicos, são cultivados como uma única camada plana sobre substratos rígidos e artificiais. Nesse cenário, as proteínas celulares interagem com proteínas do soro que revestem o substrato, simulando a matriz extracelular presente *in vivo*. No entanto, a organização original do tecido, bem como a polaridade e as interações entre proteínas são frequentemente perdidas. Isso pode levar a alterações nas integrinas e no citoesqueleto celular, afetando a morfologia inicial. O metabolismo, fenótipo e genótipo também podem sofrer modificações em comparação aos modelos *in vivo*.

Na realidade, nenhuma célula em nosso corpo cresce como uma monocamada isolada, independentemente de outras células ou tecidos. A maioria das células existe naturalmente em estruturas tridimensionais complexas, imersas em uma matriz extracelular. As numerosas interações entre células e essa matriz têm um impacto profundo em seu comportamento. Além disso, a polaridade celular não é perdida, o que é crucial para a organização e funcionalidade celular. Nesses modelos, os receptores de superfície se ligam às proteínas da matriz extracelular, desencadeando sinais bioquímicos que influenciam a proliferação, invasão, diferenciação e apoptose celular.

Para superar essas limitações, os modelos de culturas celulares 3D foram desenvolvidos. Essa abordagem permite que as células interajam com a

estrutura extracelular circundante em três dimensões. Além das diferenças estruturais entre as monocamadas, esses dois modelos têm acesso diferente a nutrientes e oxigênio. As células 2D têm acesso mais homogêneo a nutrientes, enquanto as células 3D têm menos acesso a nutrientes e oxigênio na camada interna, formando um gradiente natural que se assemelha a tecidos com densidade celular, como tumores.

As culturas celulares 3D podem ser cultivadas com ou sem suportes estruturais. Métodos sem suporte dependem das células se auto agruparem. Há exemplos populares, como o uso de placas de baixa adesão, onde as células formam sua própria matriz extracelular, e superfícies com micro padrões, que induzem as células a crescer em aglomerados. Outros métodos incluem o cultivo suspenso, onde as células formam esferoides em gotas de meio.

Alguns suportes estruturais incluem hidrogéis, que podem ser de origem animal (como Matrigel® e colágeno) ou vegetal (como alginato e agarose) ou sintetizados (como QGel® Matrix). Outras estruturas incluem matrizes inertes feitas de poliestireno, que proporcionam poros para a proliferação celular. Além de imitar melhor as estruturas de tecidos, esses modelos também podem simular condições de microambiente, como hipóxia e gradientes de nutrientes, tornando-os mais preditivos das respostas ao tratamento medicamentoso in vivo. Nesse contexto, este projeto tem como objetivo comparar o modelo 2D com o modelo esferoidal 3D na produção de matriz óssea após exposição a partículas nanoestruturadas de TiO₂.

2. JUSTIFICATIVA

No Brasil, o envelhecimento da população é um fenômeno notável. Em 1970, os idosos representavam apenas 4,95% da população, número que cresceu para 11% em 2010. Esse aumento na expectativa de vida também trouxe consigo mudanças significativas no perfil de saúde das pessoas mais velhas. A perda de dentes tornou-se uma questão complexa, frequentemente associada à extensão das cáries e à presença de doença periodontal, sendo mais prevalente entre os idosos (IBGE, 2008; LEKHOLM et al., 1999).

Na área da implantodontia, houve um aumento significativo nos investimentos, e a tendência é que essa tendência de crescimento continue nos próximos anos. Isso é uma resposta direta ao aumento da demanda por procedimentos de substituição dentária, decorrente do envelhecimento da população idosa em todo o mundo (LEKHOLM et al., 1999).

Os implantes dentários tornaram-se um componente indispensável da prática odontológica atual. O titânio é o biomaterial mais utilizado em parafusos de implantes dentários, e esse campo está em constante expansão. De acordo com as projeções, o setor de implantes dentários global pode crescer de US\$ 3,2 bilhões em 2010 para US\$ 15,9 bilhões até 2025. É importante destacar que apenas 3% da população edentulosa (sem dentes) recebeu implantes dentários até o momento, o que significa que existe uma vasta população, cerca de 97%, que poderia se beneficiar desses procedimentos. Isso reflete a crescente conscientização global sobre a importância da qualidade de vida das pessoas em idade avançada (ALGHAMDI & JANSEN, 2020; SOUZA et al., 2019).

Apesar da abundância de estudos sobre a biocompatibilidade do titânio em escalas macro e micro, seja na forma de superfícies ou nos próprios parafusos de implante, ainda há lacunas a serem preenchidas quando se trata dos efeitos biológicos em escalas nanométricas dessas partículas. Compreender as interações das células ósseas com o titânio, especialmente durante o processo de degradação ao longo do tempo, é de suma importância. Além disso, a maioria dos estudos existentes utiliza modelos 2D (monocamada) de células, enquanto os modelos 3D (esferoides) são mais representativos dos tecidos humanos e proporcionam resultados mais fidedignos.

Essas considerações abrem novas perspectivas para a realização de estudos adicionais envolvendo nanopartículas, a fim de explorar ainda mais os efeitos das nanopartículas sobre as células, como demonstrado no presente estudo. Essa pesquisa contínua é fundamental para a evolução constante dos tratamentos modernos de implantes dentários, com o objetivo de melhorar e estimular ativamente a formação óssea.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos das nanopartículas de TiO_2 na citotoxicidade, morfologia, internalização, diferenciação e produção de uma matriz mineralizada de osteoblastos humanos, cultivados tanto em monocamada (2D) quanto em modelos de cultura de esferoides (3D).

3.1 Objetivos específicos

Para isso o trabalho foi dividido nos seguintes objetivos específicos:

- Realizar dispersão de nanopartículas de titânio em meio e em água. A dispersão da suspensão do TiO_2 anatase em solução aquosa foi realizada usando a técnica de ultrassonicação com sonda direta para garantir o uso no estudo de partículas de tamanho nanométrico.
- Desenvolver modelo esferoidal utilizando células osteoblásticas (SAOS-2). Os modelos 3D foram desenvolvidos utilizando placas de fundo U com revestimento em agarose 1%
- Avaliar viabilidade celular através de testes de citotoxicidade. Após a exposição as diferentes doses do TiO_2 o teste de MTT será utilizado para avaliar a viabilidade celular.
- Avaliação morfológicas dos cultivos 2D e 3D após interação com as nanopartículas de TiO_2
- Avaliação da internalização de nanopartículas de titânio no interior dos osteoblastos.
- Analisar formação de matriz orgânica mineralizada. A produção de matriz mineralizada celular após exposição ao TiO_2 será avaliada pela coloração de vermelho de alizarina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Dispersão de anatase de titânio

NPs de TiO_2 (SIGMA, Kanagawa, Japão) com tamanho de partícula primária < 25 nm e área superficial de 45-55 m^2/g foram suspensas em água ultrapura (2 mg/mL; pH 4) e dispersas usando um ultrassom direto (Q-Sonica) equipado com uma ponta de 19 mm. A sonicação foi realizada em um banho de gelo a 32 W de potência de entrega acústica por 15 minutos com 8 s (modo pulso ligado) e 2 s (modo pulso desligado), seguindo um protocolo previamente descrito pelo grupo (RIBEIRO et al., 2016; Delgado-Ruiz & Romanos, 2018). Após 24 horas de estabilização, o tamanho das partículas e a aglomeração das partículas (análise de potencial zeta (ζ (mV)) e o índice de polidispersão (Pdl)) foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS, Zeta-Sizer Nano ZS, Malvern Instruments GmbH, Malvern, Reino Unido). As medições de DLS foram realizadas a 25 °C usando cuvetes descartáveis de poliestireno de 10 mm.

Para confirmar o tamanho das partículas no meio de cultura, as partículas de titânio foram alternadamente suspensas em meio de ágar de glicose alta de Dulbecco (DMEM, Gibco, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco) e 1 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para evitar a reaglomeração de partículas.

4.2 Cultura de células

A linha celular de osteoblastos humanos (SAOS-2) foi fornecida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil), armazenada em ampolas congeladas e mantida em nitrogênio líquido. As células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular (Corning) com meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina (PS - 10.000 unidades/mL de penicilina e 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina) (PS, Gibco) em uma incubadora umidificada (5% de CO_2 , 37 °C). A contaminação das células por bactérias, fungos ou micoplasmas foi analisada conforme relatado anteriormente (BUCKWALTER et al., 1996; BERGER et al., 2019). Para o

modelo 2D, 10.000 células/poço foram semeadas em placas de 96 poços de fundo plano padrão por 24 horas.

4.3 Cultura 3D

Para a formação de esferoides 3D, placas de fundo em U de 96 poços (Corning, Corning, NY, EUA) foram revestidas com uma fina camada de 1% de ágarose ultrapura (Sigma-Aldrich), e 10.000 células foram semeadas em cada poço em 200 µL de meio DMEM de alta glicose suplementado com 10% de FBS e 1% de PS e depois incubadas por 3 dias. O crescimento, forma e morfologia celular foram analisados em um microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse, Tóquio, Japão), seguindo um protocolo previamente descrito (RIBEIRO et al., 2016).

4.4 Citoesqueleto celular 3D

Os esferoides foram lavados com PBS 0,01 M e fixados com 4% de paraformaldeído (PFA). A membrana celular foi então permeabilizada por incubação por 2 horas com 0,2% de BSA + 0,1% de Triton X-100 em PBS 0,01 M a temperatura ambiente (RT). Os esferoides foram lavados três vezes com uma solução de bloqueio contendo 50 nM de NH₄Cl em PBS 0,01 M. Em seguida, foi adicionada uma solução de faloidina (500 ng/mL, estoque 1:40, ThermoFisher Lote: F432) diluída em 0,2% de BSA + 0,1% de Triton X-100 em PBS 0,01 M e incubada por 2 horas, seguida por mais 30 minutos com DAPI (1:500) (SIGMA-ALDRICH—Lote: 583-93-7). A morfologia celular foi visualizada usando um microscópio de fluorescência confocal (DMI 6000, Leica, Teaneck, NJ, EUA).

4.5 Exposição às NPs

Ambas as culturas de células 2D e 3D foram expostas a 0, 5 e 100 µg/mL de NPs de TiO₂ suspensas em meio osteogênico incompleto composto por DMEM suplementado com 10% de FBS, 50 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma),

100 mM de β -glicerofosfato (Sigma) e antibióticos por 3 e 21 dias. Células sem tratamento com NPs de TiO₂ foram usadas como controle.

4.6 Ensaio de citotoxicidade

Após a exposição às NPs, as células foram lavadas três vezes com PBS 0,01 M e depois incubadas com tripsina a 0,125% (mantida em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂, 37 °C) por 5 minutos. A tripsina foi bloqueada adicionando meio de cultura com 10% de FBS, e as células aderentes 2D e os esferoides 3D foram dissociados mecanicamente. As células foram centrifugadas por 7 minutos a 500 x g (4°C), e o pellet foi ressuspensão em 100 μ L de tampão de ligação de anexina (Kit de Apoptose de Células Mortas com Anexina V; *Kit Life and Dead*, Life Technologies). As amostras foram incubadas por 15 minutos (RT) em 3 μ L de solução de anexina/fluoresceína (FITC) e 1 μ L de iodeto de propídio (de acordo com as instruções do fabricante). Todas as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo (FACS Aria III, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA).

4.7 Análise de morfologia

As células foram lavadas com PBS 0,01 M e processadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em resumo, as células foram fixadas usando Karnovsky modificado (2% de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) por 2 horas a RT e lavadas com solução tampão de cacodilato 0,1 M. As amostras foram pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio em tampão de cacodilato (1:1) por 30 minutos no escuro, depois lavadas com tampão de cacodilato e desidratadas em etanol (VETEC—1567). Em seguida, para análise de MET, as amostras foram contrastadas em bloco com 1% de acetato de uranila, desidratadas em acetona e embutidas em Spurr. Seções ultrafinas foram também analisadas usando EDS no modo de microscopia eletrônica de transmissão por varredura (STEM) em um microscópio eletrônico TITAN 80-300 (FEI, Países Baixos, 300 kV).

Alternativamente, para a análise de MEV, as células foram secas em um ponto crítico (Autosamdri®-815, Série A) e metalizadas com ouro (em uma corrente de 40 mA por 90 segundos). As amostras de células 2D foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL Field Emission Gun-JSM7401F) com uma tensão de aceleração de 1 kV. As células 3D foram analisadas sob um microscópio de feixe de íons de hélio (HIM) (Carl Zeiss Orion Nanofab - corrente de feixe de 0,8 pA, usando uma pistola de elétrons para compensar a carga positiva).

4.8 Diferenciação e análise da matriz celular

A diferenciação celular foi avaliada por histoquímica de fosfatase alcalina. As células foram cultivadas em diferentes tempos (3, 7 e 21 dias). Foi usado o kit de marcação de fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich Lote: APF-1KT), que se baseia na aplicação de 500 µL de solução de sal diazônio e naftol por 30 minutos no escuro. Em seguida, a reação foi interrompida com água tridestilada. As células positivas marcadas em vermelho foram fotografadas sob um microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100), usando o programa de fotos (Leica Applications Suites - LAS EZ).

Para avaliar a produção da matriz mineralizada, foi realizada coloração com alizarina vermelha após 3, 7 e 21 dias de cultivo. As células foram fixadas com 4% de PFA e expostas a 1% de solução de alizarina vermelha (Sigma-Aldrich) a RT por 30 minutos, depois enxaguadas com água ultrapura. Para quantificar a mineralização da matriz, os nódulos positivos para alizarina vermelha foram dissolvidos em uma solução de HCl 0,5 N com SDS 5%. Os valores de densidade ótica (DO) da absorbância foram quantificados espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 450 nm usando um leitor de microplacas (*Biotek Synergy 2 multi-mode detection com software gen5*).

4.9 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). A distribuição gaussiana das amostras foi testada, e a significância estatística dos

dados foi avaliada usando ANOVA de um fator ou testes t não pareados. Os valores de p são mostrados nas figuras e a significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$. Cada experimento foi realizado três vezes, com triplicatas.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização das NPs de TiO₂

NPs de TiO₂ com um tamanho primário de 25 nm foram usadas para mimetizar as partículas de desgaste liberadas por implantes dentários. A caracterização físico-química das NPs de TiO₂ primárias já foi publicada (RIBEIRO et al., 2016; CORBO et al., 2016). Micrografias de TEM revelaram que as NPs de TiO₂ em água ultrapura estavam aglomeradas, exigindo a implementação de um protocolo de dispersão (Figura 7A). Imagens de STEM de campo escuro mostram a morfologia e aglomeração das NPs de TiO₂ após a dispersão (sonicação direta por sonda), e o mapa STEM/EDS Ti-K (em azul) confirmou a identidade das NPs de TiO₂ (Figura 7B). A análise de DLS (Figura 7C) mostrou que o diâmetro médio (DH (nm)) das NPs de TiO₂ era de 135 ± 24 nm em água e aumentava significativamente ($p < 0,05$, teste t não pareado) em meio de cultura celular (156 ± 14 nm), mantendo um índice de polidispersão (Pdl) inferior a 0,2. Finalmente, a análise do potencial zeta (ζ (mV)) em água e meio de cultura mostrou uma diminuição significativa no valor do potencial zeta após o contato com o meio, indicando a formação de uma corona proteica e iônica na superfície das NPs de TiO₂ ($p < 0,05$, teste t não pareado) (Figura 7C).

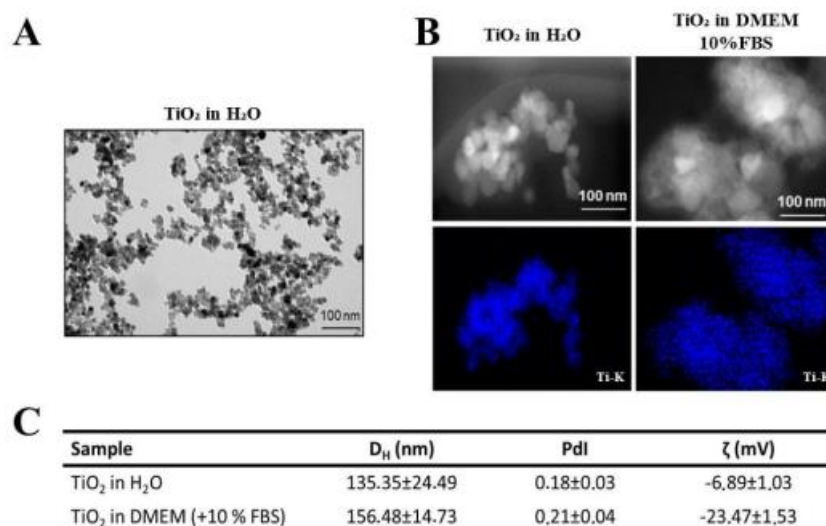


Figura 7: Caracterização das NPs de TiO₂. (A) Micrografias de transmissão eletrônica (TEM) das NPs de TiO₂ em água ultrapura sem dispersão. (B) Micrografias STEM de campo escuro das NPs de TiO₂ após dispersão em água e meio de cultura celular, e mapa Ti-K STEM/EDS confirmando a presença de titânio (em azul). Barra de escala: 100 nm. (C): Diâmetro hidrodinâmico (DH (nm)) e índice de polidispersão (PDI) das NPs de TiO₂ após dispersão em água ultrapura e meio de cultura celular obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e análise de carga superficial pelo potencial zeta das NPs de TiO₂ (ζ (mV)) em água e meio de cultura. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata de medição (* p < 0,05 vs. NPs de TiO₂ em água).

5.2 Efeito das NPs de TiO₂ na Morfologia de Osteoblastos Humanos 2D e 3D

Neste estudo, osteoblastos humanos (SAOS-2) foram cultivados como monocamadas ou esferoides. Após 72 horas de semeadura, as células foram expostas por 72 horas a 100 µg/mL de NPs de TiO₂. Imagens de microscopia óptica mostram a morfologia convencional da SAOS-2 (Figura 8A, painel esquerdo). Em monocamadas, as células exibem um fenótipo epitelial, que é mantido após a exposição às NPs de TiO₂. Os esferoides da SAOS-2 têm uma forma arredondada com um citoesqueleto bem-organizado (Figura 8B, C), mantendo também sua morfologia após a exposição ao titânio (Figura 8C). No entanto, foi observado um aumento de 29% no diâmetro e volume (p = 0,0151, teste t não pareado) após a exposição às NPs de TiO₂ (Figura 8D).

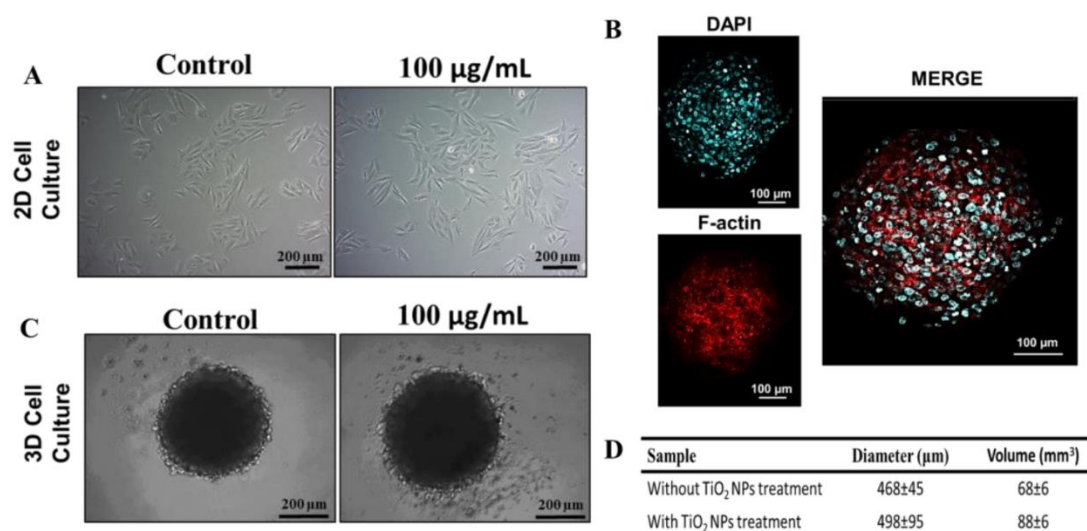


Figura 8: Tratamento das NPs de TiO₂ em culturas 2D e 3D de osteoblastos humanos (SAOS-2): (A) Micrografia de contraste de fase de SAOS-2 em 2D com ou sem exposição a 100 µg/mL de NPs de TiO₂ por 72 h (escala: 200 µm). (B) Citoesqueleto de esferoides (3D), núcleo em azul (corado com DAPI) e os filamentos de actina em vermelho (corados para F-actina) (escala: 100 µm). (C) Micrografia de contraste de fase de SAOS-2 em 3D com ou sem exposição a 100 µg/mL de NPs de TiO₂ por 72 h (escala: 200 µm). (D) Diâmetro médio e volume dos esferoides. A condição basal foi utilizada como controle. Os resultados são imagens representativas de três experimentos independentes.

Para confirmar se ocorreram alterações ultraestruturais após o tratamento com as NPs de TiO₂, foi realizada uma análise de microscopia eletrônica de varredura (SEM), que mostrou que as SAOS-2 em 2D e esferoides (3D) mantiveram sua morfologia após 3 dias de exposição às NPs de TiO₂, sem alterações em seu contato célula-célula (Figura 9A, B). Além disso, a análise SEM-EDS confirmou a presença das NPs de TiO₂ na superfície de ambos os modelos celulares. Um detalhe da interação das NPs de TiO₂ com os esferoides (Ti-K, marcado em azul) pode ser observado na Figura 9C.

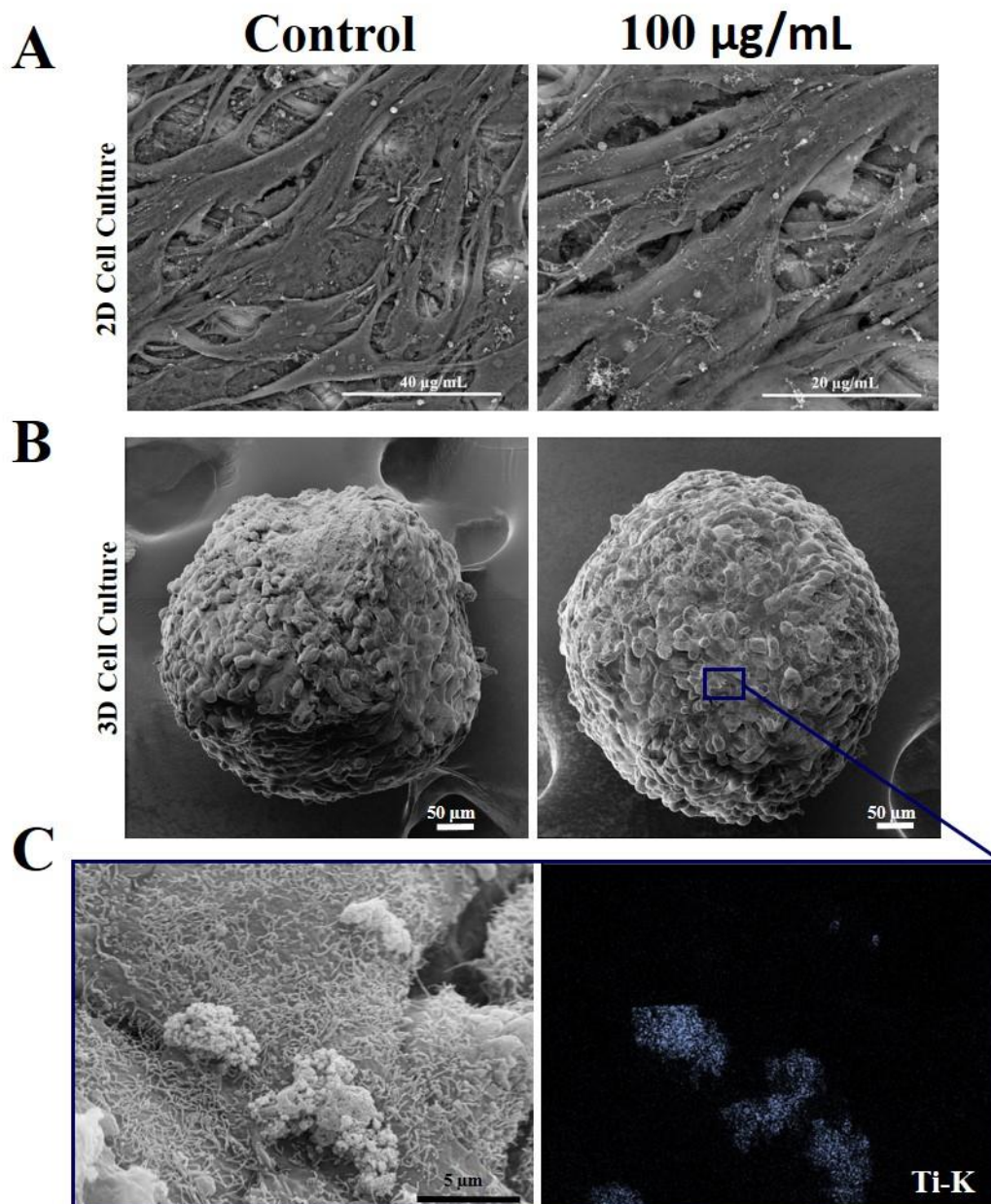


Figura 9: Morfologia de osteoblastos humanos (SAOS-2) cultivados em 2D e 3D após exposição às NPs de TiO₂: (A) Micrografias de varredura eletrônica mostrando SAOS-2 cultivados em 2D e em esferoides (B) após tratamento com 100 µg/mL de NPs de TiO₂ por 3 dias. (C) Análise de mapa Ti-K por STEM/EDS. Ti é mostrado em pontos azuis interagindo com as células. Controle: cultivo sem NPs. Os resultados são imagens representativas de três experimentos independentes. (escala: 40 µm, 20 µm, 50 µm e 5 µm).

5.3 Efeito das NPs de TiO₂ na Viabilidade de Osteoblastos Humanos

A análise de citometria de fluxo com PI/anexina após 3 e 21 dias de cultura não mostrou citotoxicidade das NPs de TiO₂, tanto nos modelos de

monocamada (Figura 10A) quanto nos modelos de esferoides (Figura 10B). Os níveis de apoptose e necrose foram semelhantes em todas as condições avaliadas.

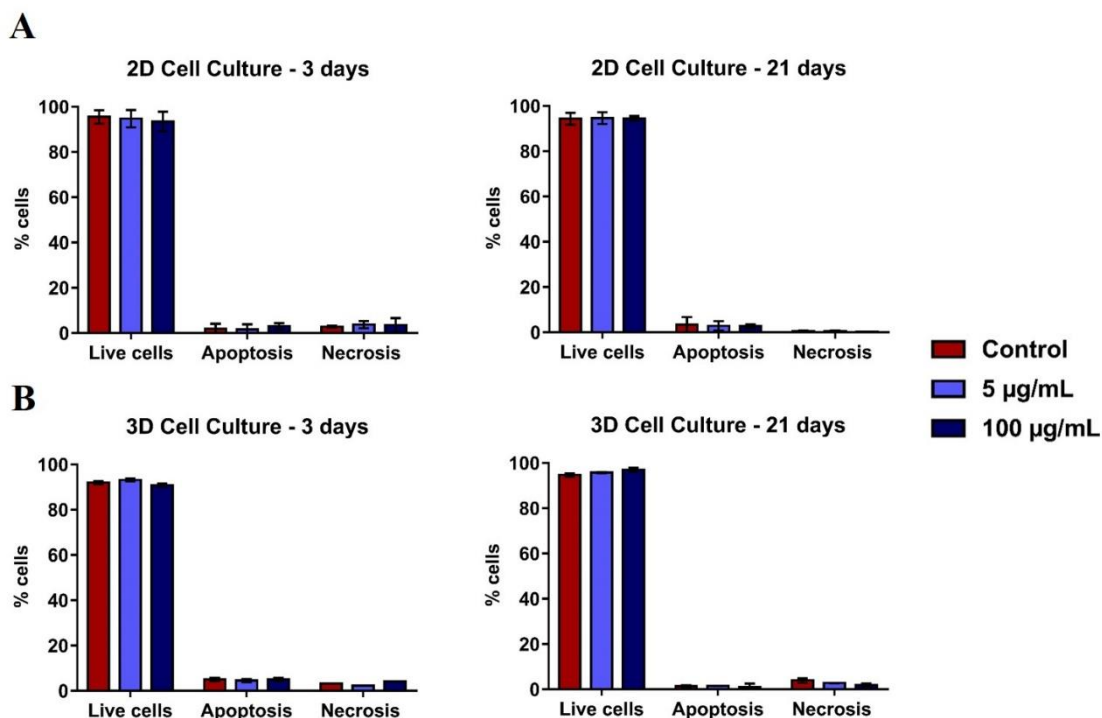


Figura 10: Viabilidade de osteoblastos humanos em 2D e 3D (SAOS-2): SAOS-2 foram expostos às NPs de TiO₂ (100 µg/mL) por 3 e 21 dias, e o ensaio PI/Anexina foi realizado por citometria de fluxo das células em (A) 2D e (B) 3D. A condição de referência foi utilizada como controle. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes (sem diferença estatística).

5.4 Internalização das NPs de TiO₂ em Culturas de Osteoblastos Humanos 2D e 3D

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostrou, tanto nos modelos 2D quanto 3D, a internalização das NPs de TiO₂, que preferencialmente se localizavam no citoplasma celular em vesículas semelhantes a membranas ou após a interrupção da membrana celular, possivelmente em corpos multivesiculares (MVBs) ou autofagolisossomas delimitados pela membrana (Figura 11).

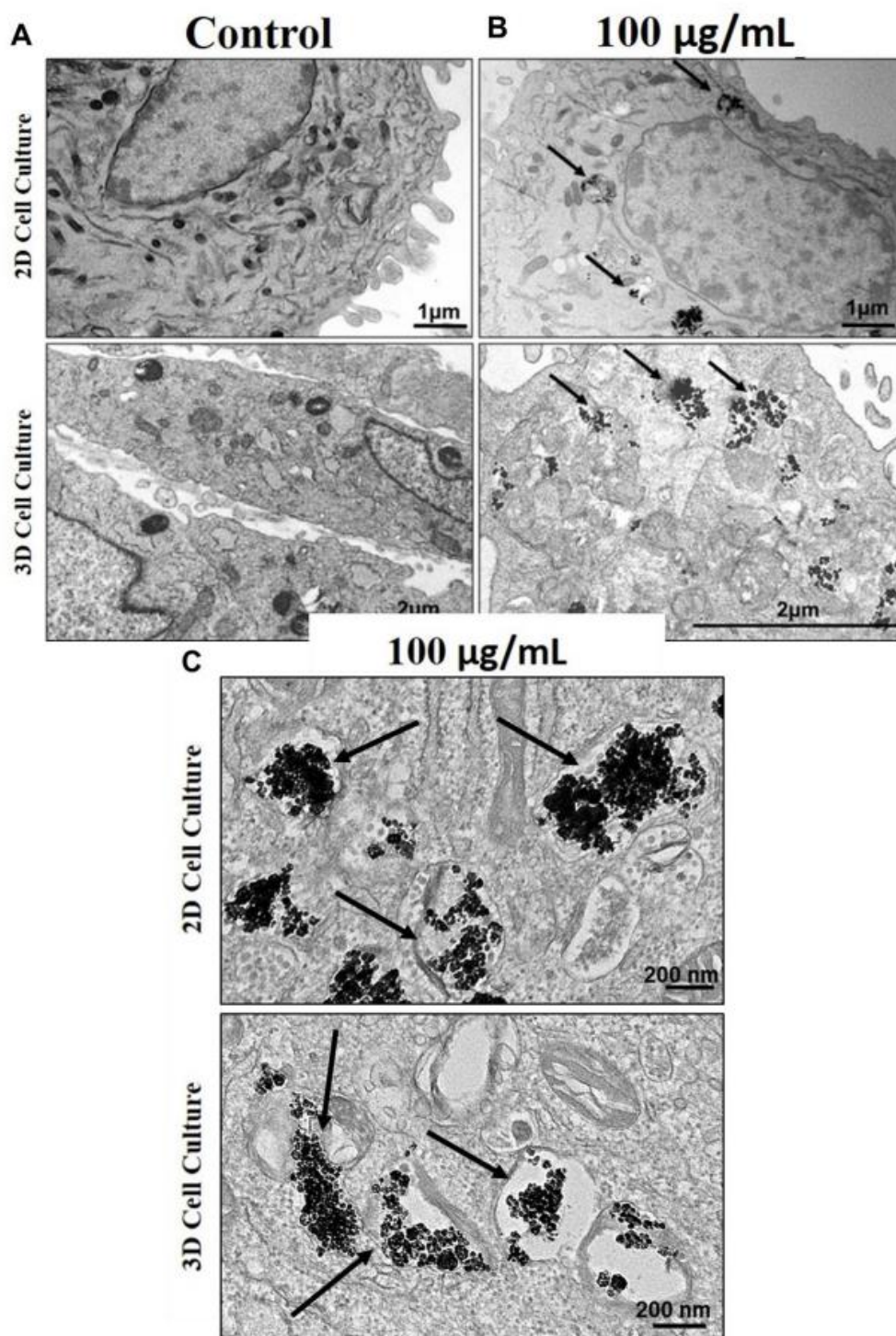


Figura 11: Internalização de NPs de TiO₂: Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostrando a internalização de NPs de TiO₂ em osteoblastos humanos (SAOS-2) cultivados por 72 horas: (A) controle, cultivado sem NPs ou (B, C) tratado com 100 µg/ mL de NPs de TiO₂ (seta preta). Os resultados são imagens representativas de três experimentos independentes. (escala: 1 µm, 2 µm e 200 nm).

5.5 Diferenciação e Mineralização de Osteoblastos Humanos após a Exposição a NPs de TiO₂

Para entender a influência das NPs de TiO₂ na diferenciação e mineralização de ambos os modelos celulares (2D e 3D), foram realizadas análises de fosfatase alcalina (ALP) (marcador de diferenciação) e alizarina vermelha (marcador de mineralização). Para essas análises, os osteoblastos foram cultivados por até 14 dias, e foram utilizadas duas concentrações de exposição (5 e 100 µg/mL) de NPs de TiO₂. Dados anteriores em osteoblastos primários humanos mostraram que o tratamento com NPs de TiO₂ não aumentou a marcação para ALP (marcada em vermelho) após 14 dias de cultivo (12A). No entanto, na análise de mineralização, houve um aumento dependente da dose na coloração de alizarina após 14 dias de tratamento com 100 µg/mL (marcado em vermelho intenso) em comparação com o controle (Figura 12B).

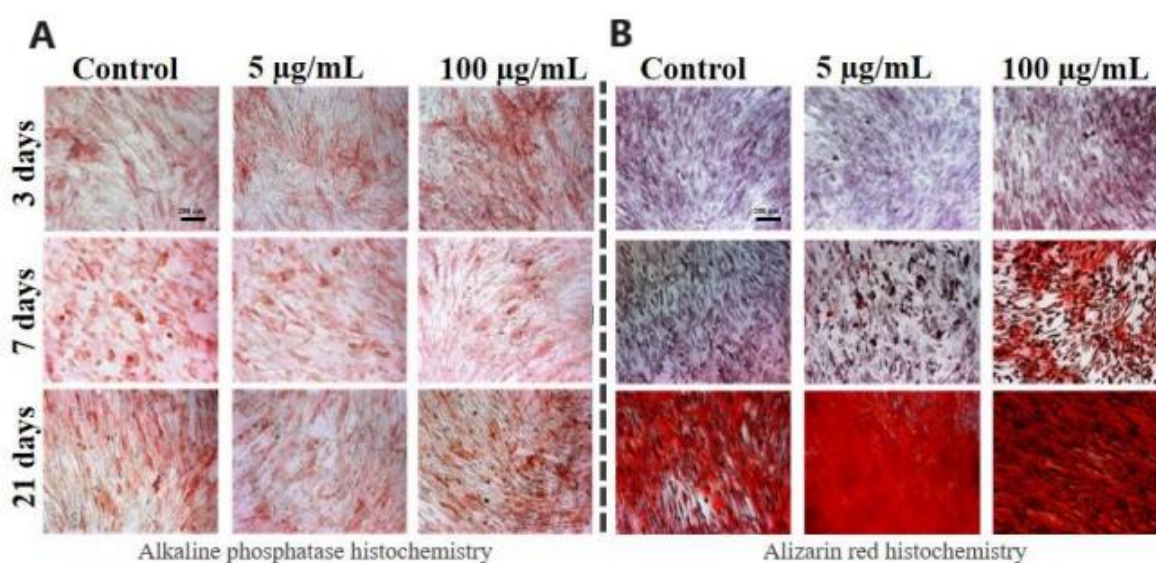


Figura 12: Diferenciação e mineralização de osteoblastos primários: A coloração de fosfatase alcalina e vermelho de alizarina em osteoblastos humanos primários após exposição por 3, 7 e 14 dias a concentrações de 5 µg/mL e 100 µg/mL de de NPs de TiO₂. As imagens mostradas são representativas de três experimentos independentes. A barra de escala indica uma medida de 200 µm.

Para comparar as diferenças na mineralização nos modelos 2D e 3D, realizamos a coloração com alizarina após 3, 7 e 14 dias após a exposição a 5 µg/mL ou 100 µg/mL de NPs de TiO₂ em ambos os modelos. Os resultados de alizarina vermelha mostraram um aumento significativo na mineralização dependente da dose após 14 dias em comparação com o controle, tanto no

modelo 2D (Figura 13A) quanto no modelo 3D (Figura 13B). Além disso, quando os valores de tratamento são normalizados pelos valores de controle, o aumento na mineralização é maior no modelo 3D em comparação com o modelo 2D, sugerindo que ambos os modelos podem apresentar resultados diferentes na avaliação da mineralização (Figura 13C e imagens representativas na Figura 13D).

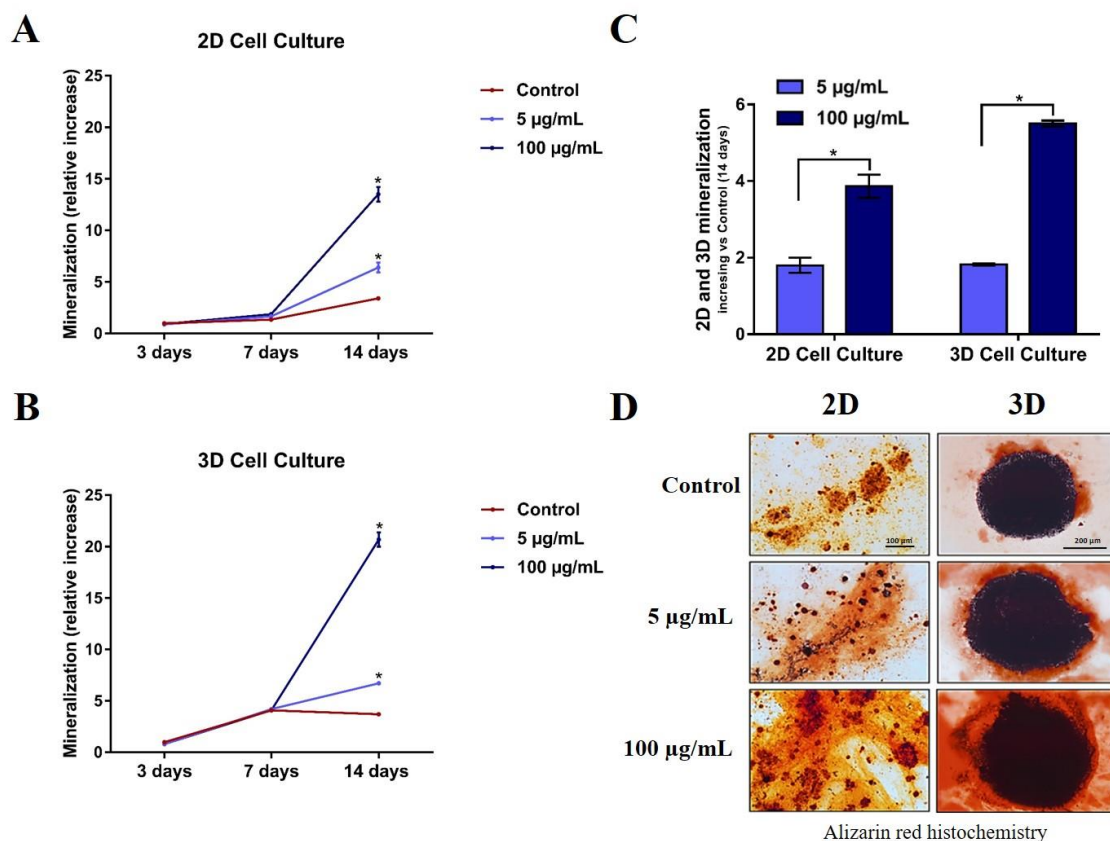


Figura 13: Matriz mineralizada produzida por osteoblastos humanos (SAOS-2) em células 2D e 3D expostas a NPs de TiO_2 (0, 5 e 100 $\mu\text{g/mL}$) durante 3 e 14 dias em meio osteogênico. O ensaio com Alizarina vermelha mostra uma produção de matriz dependente da dose em (A) modelo 2D de SAOS-2 e (B) modelos 3D de SAOS-2. Os gráficos em (C) apresentam uma comparação entre a produção de matriz inorgânica em ambos os modelos 2D e 3D em 14 dias (tempo experimental final), normalizada em relação a cada controle para mostrar o aumento na mineralização dependente da dose nos diferentes modelos. Os resultados são média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes * $p < 0,05$; (D) imagens representativas obtidas por microscopia óptica.

6. DISCUSSÃO

O titânio é amplamente utilizado na indústria de implantes dentários devido às suas características excepcionais, como alta resistência mecânica, baixo módulo de elasticidade, resistência à corrosão, ductilidade e compatibilidade biológica (CORBO et al., 2016, KIRMANIDOU et al., 2016). No entanto, problemas de tribocorrosão na superfície dos implantes podem levar à rápida perda de osso, comprometendo a osseointegração e aumentando as falhas periprotéticas (RIBEIRO et al., 2016; DELGADO-RUIZ & ROMANOS, 2018; COBO et al., 2016; KIRMANIDOU et al., 2016; KHEDER et al., 2021; ROMANOS, 2015; TUAN et al., 2008). Esse fenômeno resulta da interação entre o ambiente eletroquímico hostil, caracterizado por reações de oxidação e redução, e as forças mecânicas na interface implante-tecido, que permitem a ocorrência da tribocorrosão (CHATZINIKOLAIDOU, 2016; SCHOICHET et al., 2021).

Consequentemente, produtos de degradação, como íons metálicos e detritos metálicos em escala micrométrica e nanométrica (NPs de TiO_2), são liberados pelos implantes e podem ser absorvidos pelas células na região óssea, potencialmente causando efeitos citotóxicos (CORBO et al., 2016, CHATZINIKOLAIDOU, 2016; KIRMANIDOU et al., 2016). Os efeitos adversos das NPs de TiO_2 são variáveis na literatura, o que tem suscitado preocupações entre autoridades e profissionais de saúde, devido à sua prevalência significativa (CORBO et al., 2016; CHATZINIKOLAIDOU, 2016, CHRISTO et al., 2015). Os dados da literatura apontam que os estímulos inflamatórios, que incluem a superprodução de citocinas e o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, são considerados os principais efeitos tóxicos que levam à morte celular (CORBO et al., 2016, CHATZINIKOLAIDOU, 2016, CHRISTO et al., 2015, GEBHARD et al., 2016).

Alguns pesquisadores explicam que esse mecanismo desencadeia a ativação das células imunológicas de defesa e o acúmulo de antígenos, como íons, nanopartículas, micropartículas e antígenos bacterianos, na interface funcional entre o implante dentário e o tecido circundante. Esse processo resulta na polarização das respostas imunológicas das células e, por fim, na perda do

implante dentário (KELLER et al., 2017; MAIA-PINTO et al., 2020, Jensen & Teng, 2020; BIAŁKOWSKA et al., 2020).

A maioria dos estudos disponíveis que investigam a resposta dos osteoblastos às NPs de TiO_2 utiliza modelos de cultura celular em duas dimensões (2D), que apresentam limitações em relação ao crescimento celular e às interações entre células e sua matriz extracelular, entre outros fatores. Poucos estudos avaliam como as NPs de TiO_2 afetam a fisiologia das células ósseas em modelos tridimensionais (3D), como esferoides (RIBEIRO et al., 2016). Os esferoides de osteoblastos são considerados modelos de cultura que melhor replicam as características estruturais e biofuncionais das células vivas, proporcionando resultados mais confiáveis quando comparados às culturas celulares 2D tradicionais (RIBEIRO et al., 2016, KELLER et al., 2017, DALY et al., 2021).

No entanto, é importante ressaltar que a cultura em esferoides também apresenta limitações, principalmente devido à exposição heterogênea das células ao meio de cultura, o que pode resultar na formação de microambientes dentro dos esferoides, afetando grupos específicos de células (HOLUB et al., 2020, YUSTE et al., 2021). Além disso, a difusão limitada de nutrientes e oxigênio pode induzir áreas necróticas no centro dos esferoides. No entanto, esferoides multicelulares bem caracterizados exibem diferentes níveis de produção de matriz extracelular, secreção de fatores de crescimento e perfis de expressão gênica. A viabilidade, morfologia e expressão gênica dos esferoides de osteoblastos dependem das interações físicas entre as células e o meio circundante (SAWA et al., 2019). Notavelmente, estudos relatam que osteoblastos primários e pré-osteoblastos MC3T3-E1 podem se diferenciar em osteócitos quando cultivados em modelos tridimensionais (SAWA et al., 2019). Portanto, os modelos de cultura 3D oferecem uma plataforma valiosa para estudar as reações fisiopatológicas das NPs de TiO_2 no metabolismo ósseo em comparação com as culturas 2D (Figura 14).

Em um estudo anterior conduzido por Souza et al., (2019) sobre o efeito citotóxico das NPs de TiO_2 em esferoides de osteoblastos, foi observado que uma exposição de 72 horas às NPs de TiO_2 pode alterar o ciclo celular, sem interferir na capacidade dos osteoblastos de se diferenciarem e mineralizarem. Além disso, a exposição aumentou significativamente a secreção de colágeno e

citocinas pró-inflamatórias. No presente estudo, um período de exposição mais longo (21 dias) foi avaliado para comparar os modelos de osteoblastos em 2D e 3D, com o objetivo de obter uma compreensão mais profunda de sua relevância nos estudos de nanotoxicologia.

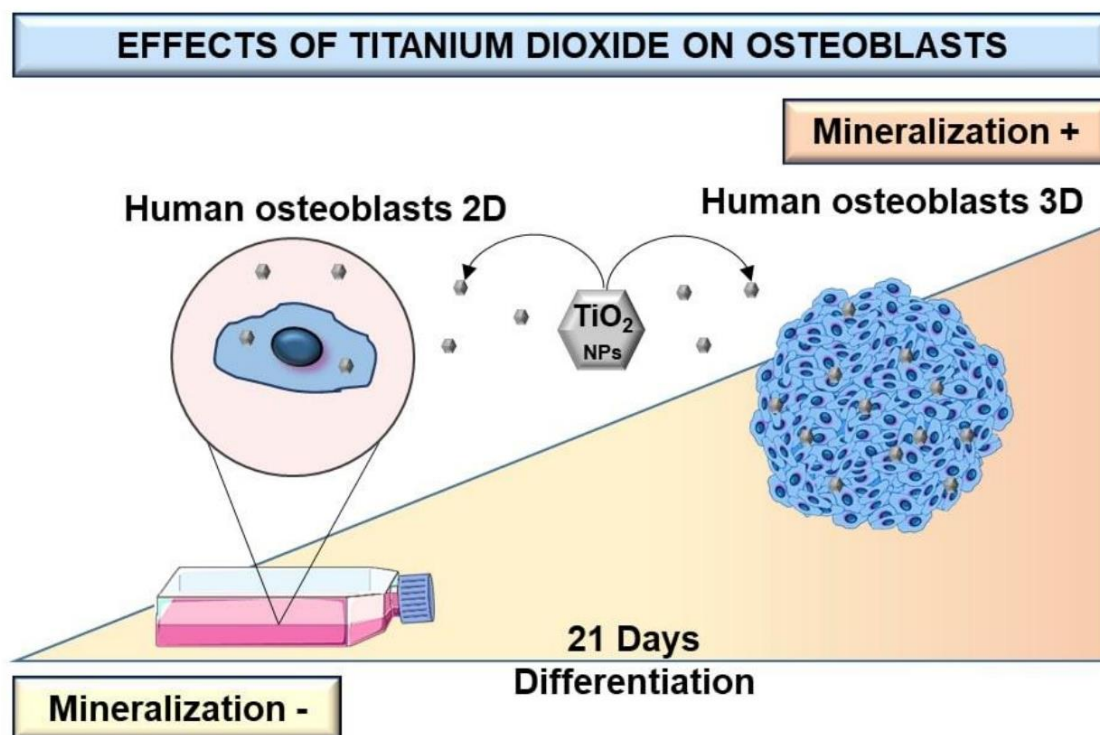


Figura 14: Esquema de diferenciação e produção de matriz mineralizada de osteoblastos humanos SAOS-2 cultivados em monocamada e modelos de células esféricas 3D após exposição ao TiO₂. Após alta exposição às NPs de TiO₂, o aumento dependente da dose da matriz mineralizada óssea no modelo de células 3D é maior do que na cultura em monocamada (2D).

As nanopartículas de TiO₂ são notáveis por sua estabilidade química, propriedades antibacterianas e menor capacidade de induzir toxicidade em comparação com outras nanoestruturas. Quando expostas ao ambiente biológico, essas partículas têm a capacidade de seletivamente atrair proteínas do plasma sanguíneo e íons para sua superfície externa (ARORA et al., 2012). A complexa interação entre as nanopartículas e o ambiente biológico depende tanto das características físicas e químicas das nanopartículas quanto das propriedades biológicas desse ambiente (GURUMURTHY et al., 2017).

No decorrer deste estudo, observou-se que as nanopartículas de TiO₂ apresentavam um tamanho médio de 150 nm no meio de cultura. Contudo, notou-se um aumento no tamanho médio após a introdução do meio de cultura,

devido à adsorção de proteínas e íons na superfície das nanopartículas de TiO_2 . Esse fenômeno pode ser correlacionado com a mudança na carga superficial das partículas, conforme identificado por meio da análise do potencial zeta. Além disso, em pesquisas anteriores, foi confirmada a adsorção de cálcio e fosfato na superfície das nanopartículas de TiO_2 , substâncias cruciais na mediação da mineralização óssea (CORBO et al., 2016).

Para compreender como as nanopartículas de TiO_2 influenciam a mineralização das células ósseas, utilizamos uma linhagem de osteoblastos maduros, cultivados tanto em monocamada (2D) quanto na forma de esferoides (3D). A caracterização prévia já havia sido realizada para as células em monocamada (BUCKWALTER et al., 1996). Ambos os modelos (2D e 3D) foram expostos a uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas por um período de 21 dias. Em ambos os modelos, observou-se a internalização das nanopartículas de TiO_2 em vesículas de membrana após 72 horas de exposição. Alguns estudos indicam que a internalização das nanopartículas pode ocorrer de maneira dependente da dose, com uma tendência a se acumular preferencialmente na região perinuclear e, por fim, serem direcionadas aos lisossomos (ARORA et al., 2012; YAMADA et al. 2022).

Em condições normais, as nanopartículas de TiO_2 não são comumente encontradas dispersas no citoplasma celular (CORBO et al., 2016; ARORA et al., 2012; YAMADA et al., 2022). No entanto, o efeito dessas nanopartículas nas células está diretamente relacionado à distribuição do tamanho das partículas, sua estrutura cristalina e a formação de uma corona protetora ao seu redor (ARORA et al., 2012). Recentemente, foi demonstrada a formação de uma camada externa rica em cálcio, fósforo e cristais de hidroxiapatita ao redor das nanopartículas de TiO_2 , o que facilita sua internalização tanto em modelos osteoblásticos em 2D quanto em 3D, uma vez que os elementos químicos detectados desempenham um papel fundamental no metabolismo e na mineralização óssea (RIBEIRO et al., 2016; ARORA et al., 2012; HO et al., 2016).

Os resultados deste estudo revelaram que as nanopartículas de TiO_2 não afetaram a viabilidade dos osteoblastos em nenhum dos modelos celulares testados (2D e 3D) ao longo de 21 dias de exposição. Além disso, não houve alterações significativas na morfologia dos osteoblastos ou na forma esférica dos esferoides após a internalização das nanopartículas. Curiosamente, as

nanopartículas foram capazes de estimular um aumento na deposição de cálcio, indicando a ativação de um processo de mineralização nas estruturas esféricas de osteoblastos. A análise da síntese da fosfatase alcalina e da marcação do cálcio demonstrou que as nanopartículas de TiO_2 potencializaram a diferenciação dos osteoblastos, resultando em uma maior mineralização em modelos de cultura tridimensional. Esse achado sugere que a arquitetura em 3D pode ampliar a interação das nanopartículas com a superfície celular, que já havia sido relatada como sendo "camuflada" pela camada externa rica em elementos como cálcio e fósforo (RIBEIRO et al., 2016).

O aumento da mineralização observado em modelos 3D após a exposição às nanopartículas pode ser atribuído à maior superfície celular disponível para interação com as partículas, em comparação com as monocamadas (2D), intensificando, assim, os efeitos estimulatórios das nanopartículas de TiO_2 (CUEVAS-GONZÁLEZ et al., 2021). Essa observação é consistente com estudos anteriores que demonstraram que modelos osteoblásticos em 3D, quando expostos a nanopartículas de TiO_2 , induzem a secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), ativando uma série de eventos que culminam em uma maior produção de colágeno do tipo I (KIM et al., 2005; CHATZINIKOLAIDOU et al., 2016; ROCHA et al., 2020; CUEVAS-GONZÁLEZ et al., 2021; LEE et al., 2021).

A mineralização óssea representa o primeiro passo fundamental para a osseointegração de implantes e começa com o colágeno tipo I atuando como uma estrutura tridimensional que facilita a deposição de hidroxiapatita (BUZEA et al., 2007). Um estudo anterior também demonstrou uma maior diferenciação osteogênica quando as células foram cultivadas em gel de colágeno em 3D (SENNA et al., 2015). Vale destacar que em estudos de interação com nanopartículas, os modelos de células em monocamada (2D) não parecem ser o cenário mais adequado, enquanto os esferoides tridimensionais surgem como uma alternativa promissora, especialmente em aplicações de bioimpressão de tecidos em 3D com uso de biomateriais como andaimes, representando uma tecnologia inovadora para a melhoria da osteointegração óssea (DUVAL et al., 2017).

Infelizmente, na literatura não há um consenso sobre como avaliar o efeito biológico das NPs de TiO_2 . A ausência de protocolos padronizados para

avaliar os impactos biológicos das NPs torna necessário validar avaliações seguras e reduzir os possíveis impactos na saúde, avançando na avaliação e desenvolvimento de novos modelos de estudo celular que melhor reproduzam o ambiente biológico (YAMADA et al., 2022).

Embora os esferoides osteoblásticos tenham suas vantagens em comparação com as monocamadas, como a capacidade de reprodução, melhor difusão de nutrientes e oxigênio, interações celulares aprimoradas, deposição de matriz e modelos abrangendo várias fases celulares (proliferativas, quiescentes, apoptóticas, hipóxicas e necróticas) (CHATZINIKOLAIDOU, 2016; BUZEA et al., 2007), os modelos tridimensionais de esferoides ainda não foram validados como representações realistas *in vitro* (CHATZINIKOLAIDOU, 2016, BUZEA et al., 2007; DALY et al., 2021). Uma das principais limitações dos esferoides é a dificuldade em estudar a porosidade e as propriedades mecânicas. Portanto, é necessário direcionar esforços para aprimorar os modelos tridimensionais de células ósseas, a fim de reproduzir de maneira mais precisa o microambiente ósseo, que é conhecido por ser composto por diferentes tipos celulares e ser dinâmico e metabolicamente ativo.

As NPs de TiO₂ liberadas de implantes dentários são, por um lado, consideradas como a causa da perda óssea peri-implantar em contextos clínicos; por outro lado, podem ser capazes de estimular a produção de uma matriz extracelular mineralizada em esferoides de osteoblastos (DALY et al., 2021). Outro aspecto importante é que os esferoides podem responder de maneira mais fisiológica aos estímulos das NPs de TiO₂, o que sustenta o desenvolvimento de novos estudos para criar novos modelos aplicados. Isso é relevante em estudos clínicos, visando facilitar o processo de remodelação óssea e oferecer tratamentos alternativos para condições como periodontite e peri-implantite. Além disso, os próprios esferoides podem ser aplicados a modelos de tecidos de alta densidade celular, representando uma tecnologia inovadora para procedimentos de aumento ósseo e substituição de tecidos moles (AMENGUAL-PEAFIEL et al., 2021). Portanto, a combinação das NPs de TiO₂ com células de esferoides surge como uma abordagem interessante para a reconstrução de tecidos.

Por fim, nossos resultados demonstram que as NPs de TiO₂ aumentam a deposição de cálcio em culturas tridimensionais em comparação com culturas

bidimensionais. Embora este estudo tenha revelado descobertas intrigantes sobre o comportamento e o papel das NPs de TiO_2 na promoção da mineralização apenas em modelos tridimensionais, é importante ressaltar que nossos resultados estão limitados às condições testadas e à configuração experimental utilizada. Portanto, é fundamental incentivar estudos adicionais e realizar avaliações mais aprofundadas por meio da quantificação de genes que desempenham um papel na diferenciação e mineralização. Entretanto, nossos resultados contribuem para uma melhor compreensão do possível impacto da cultura tridimensional na odontologia e também abrem espaço para discussões sobre a dupla função das NPs de TiO_2 , que, por um lado, podem desencadear uma resposta inflamatória levando à reabsorção óssea, mas, por outro lado, estimulam a mineralização. Nossas descobertas são consideradas clinicamente relevantes, uma vez que, pela primeira vez, relatamos que, na interface entre osso e implante, as NPs de TiO_2 , além de ativarem macrófagos, também podem estimular osteoblastos, desempenhando um papel fundamental no processo de mineralização.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo, submetemos células a exposição de NPs de TiO_2 em concentrações de até 100 $\mu\text{g/mL}$, utilizando modelos celulares 2D e 3D durante um período de até 21 dias. Os agregados de TiO_2 foram habilmente reduzidos para tamanhos nanométricos e passaram por uma caracterização precisa. Surpreendentemente, a internalização das NPs em ambos os modelos celulares não exibiu alterações significativas na morfologia ou na sobrevivência celular.

Além disso, observou-se que a mineralização óssea foi induzida de maneira dose-dependente em ambos os modelos de cultura. No entanto, um resultado intrigante surgiu: o processo de mineralização demonstrou ser mais acentuado no modelo de cultura de esferoides 3D em comparação com o modelo de monocamada 2D. Essa descoberta abre espaço para uma nova e empolgante discussão sobre os potenciais vantagens das NPs de TiO_2 no contexto da mineralização óssea.

Essa constatação pode sugerir que as partículas nanométricas têm um papel benéfico a desempenhar no processo de osseointegração em implantes dentários de titânio. A possível redução de falhas periprotéticas representa um avanço significativo na odontologia e na medicina, destacando o potencial promissor das nanopartículas de TiO_2 . Além disso, essa pesquisa revela o valor dos modelos celulares 3D como uma tecnologia inovadora para aprimorar a osteointegração óssea induzida por nanopartículas, abrindo novos horizontes para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e seguros no futuro.

8. REFERENCIAS

Alghamdi HS, JANSEN JA (2020) The development and future of dental implants. *Dental Materials Journal*; 39(2): 167–172.

Amengual-Peafiel L, Córdova LA, Jara-Sepúlveda MC, Braes-Aroca M, Marchesani-Carrasco F, Cartes-Velásquez R (2021) Osteoimmunology drives dental implant osseointegration: A new paradigm for implant dentistry. *Japanese Dental Science Review*; 57, 12–19.

Andia DC, Cerri PS, Spolidorio LC (2006) Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Revista de Odontologia da UNESP, Araraquara*, v.35, n.2, p.191-198.

Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM (2012) Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258, 151–165.

Baelum V, Luan WM, Chen X, Fejerskov O (1997) Predictors of tooth loss over 10 years in adult and elderly Chinese. *Community Dent Oral Epidemiol*; 25(3): 204-10.

Berger JM, Singh P, Khrimian L, Morgan DA, Chowdhury S, Arteaga-Solis E, Horvath TL, Domingos AI, Marsland AL, Yadav VK, Rahmouni K et al (2019) Mediation of the acute stress response by the skeleton. *Cell Metabolism* 30, 890–902. November 5, Elsevier Inc.

Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K (2020) Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *International Journal of Molecular Sciences*; 21, 6225.

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR (1996) Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional Course Lectur.*, v. 45, p. 371– 386.

Buzea C, Pacheco II, Robbie K (2007) Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*; 2, MR17–MR71.

Chatzinikolaidou M (2016) Cell spheroids: the new frontiers in vitro models for cancer drug validation. *Drug Discovery 587 Today*; 21, 1553–1560.

Christo NN, Diener KR, Bachhuka A, Vasilev K, Hayball JD (2015) Innate Immunity and Biomaterials at the Nexus: Friends or Foes. *BioMed Research International*; 1–23.

Chung KW, Chung HM (2017) Gross Anatomy, Sixth Edition, Wolters Kluwer: Lippincott, Williams and Wilkins, Chapter 1.

Cooper GM (2000). Cell walls and the extracellular matrix. In *The cell: a molecular approach* (2nd ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9874/>.

Corbo C, Molinaro R, Parodi A, Furman TNE, Salvatore F, Tasciotti E (2016) Impact of the nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity, and target drug delivery. *Nanomedicine*, 11, 81–100.

Costa e Silva A, Mei PR (2010) *Aços e Ligas Especiais*. 3. ed. São Paulo: Edgard Blucher.

Cuevas-González MV, Suaste-Olmos F, Cuevas-González JC, Álvarez-Pérez MA (2021) 3D Spheroid Cell Cultures and Their Role in Bone Regeneration: A Systematic Review. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*, 178–191. doi:10.15517/ijds.2022.49151.

Daly AC, Davidson MD, Burdick JA (2021) 3D bioprinting of high-cell-density heterogeneous tissue models through spheroid fusion within self-healing hydrogels. *Nature Communications*; 12, 75

Datta, HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS (2008) The cell biology of bone metabolism, *Journal of Clinical Pathology*, v. 61, n. 5, p. 577–587.

Delgado-Ruiz R, Romanos G (2018) Potential Causes of Titanium Particle and Ion Release in Implant Dentistry: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 3585.

Downey PA, Siegel MI (2006) Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Physical Therapy*, v. 86, n. 1, p. 77–91.

Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z (2017) Modeling physiological events 548 in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, 32, 266–277.

Florencio SR, Sasso GRS, Cerri ES, Simoes MS, Cerri OS (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International* v. 2015, p. 1-17.

Gebhard C, Gabriel C, Walter I (2016) Morphological and Immunohistochemical Characterisation of Canine Osteosarcoma Spheroid Cell Cultures. *Anatomia, Histologia, Embryologia*; 45, 219–230. 25.

Gupta V, Grande-Allen KJ (2006) Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc Res*. 72(3): 375-83.

Gurumurthy B, Bierdeman PC, Janorkar AV (2017) Spheroid model for functional osteogenic evaluation of human adipose-derived stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105, 1230–1236.

Ho SS, Murphy KC, Binder BYK, Vissers CB, Leach JK (2016) Increased Survival and Function of Mesenchymal Stem Cell Spheroids Entrapped in Instructive Alginate Hydrogels. *Stem Cells Translational Medicine*; 5, 575 773–781.

Hollinger JO (2012) Consensus definitions, fundamental concepts, and a standardized approach to applied biomaterials sciences. In: *An Introduction to Biomaterials*. 2. ed. New York: Taylor and Francis Group, p. 1–4, 2012

Holub AR, Huo A, Patel K, Thakore V, Chhibber P, Erogbogbo F (2020) Assessing Advantages and Drawbacks of Rapidly Generated Ultra-Large 3D Breast Cancer Spheroids: Studies with chemotherapeutics and Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*; 21, 4413

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2008) *Projeção da população do Brasil por sexo e idade 1980- 2050: Revisão 2008*. Rio de Janeiro: IBGE, 2008. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv41229.pdf>

Jensen C, Teng Y (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7.

Junqueira LCU, Carneiro J (2005) *Biologia Celular e Molecular*. 8ª. Edição. Editora Guanabara. Koogan, Rio de Janeiro, p. 137-147.

Junqueira LCU, Carneiro J, Abrahamsohn P (2017). *Histologia Básica: texto e atlas*. 13ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. *Histologia E Biologia Celular*, Editora Elsevier Brasil, 3ª ed. Pag 134-136 – 2012

Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Eap S, Brasse D, Schwinté P, Arruebo M, Benkirane-Jessel N (2017) Nanoengineered implant as a new platform for regenerative nanomedicine using 3D well-organised human cell spheroids. *International Journal of Nanomedicine*; v. 12, 447–457. 26.

Kheder W, Kawas SA, Khalaf K, Samsudin AR (2021) Impact of tribocorrosion and titanium particles release on dental implant complications: a narrative review. *Japanese Dental Science Review*; 57, 182–189.

Kierszenbaum BL, Tres LL (2012) *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. 3º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 720p.

Kim JB (2005) Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*; 15, 365–377.

Kirmanidou Y, Sidira M, Drosou M, Bennani V, Bakopoulou A, Tsouknidas A, Michailidis N, Michalakakis K (2016) New Ti-Alloys, and Surface Modifications to

Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review BioMed Research International; 1–21.

Lee HJ, Song YM, Baek S, Park YH, Park JB (2021) Vitamin D Enhanced the Osteogenic Differentiation of Cell Spheroids Composed of Bone Marrow Stem Cells. *Medicina (B Aires)*, 57, 1271.

Lekholm U, Gunne J, Henry P, Higuchi K, Lindén U, Bergström C, Steenberghe DV (1999) Survival of the Brånemark implant in partially edentulous jaws: a 10-year prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants*; 14: 639-645.

Lemons JE, Misch FD (2000) Biomateriais utilizados em implantes dentários. In: Misch CE (2000) *Implantes dentários contemporâneos*. Santos, p. 271- 277.

Liu X, Chu PK, Ding C (2004) Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, v.27, n.3-4, p.49-121.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000). Noncollagen components of the extracellular matrix. In *Molecular cell biology* (4th ed., section 22.4). New York, NY: W. H. Freeman. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21706/>.

Long M, Rack HJ (1998) Titanium alloys in total joint replacement — a materials science perspective. *Biomaterials*, v.19, n.18, p.1621-1639.

Maia-Pinto MOC, Brochado ACB, Teixeira AFN, Sartoretto SC, Uzeda MJ, Alves ATNN, Alves GG, Calasans-Maia MD, Thiré RMSM (2020) Biomimetic Mineralisation on 3D Printed PLA Scaffolds: On the Response of Human Primary Osteoblasts Spheroids and In Vivo Implantation. *Polymers (Basel)*; 13, 74.

Moore LK, Agur, AR, Dalley, F (2013) *Fundamentos de Anatomia Clínica*, 4ª edição, 4th Edition. Guanabara Koogan, 01/2013. VitalBook file.

Nordin M, Frankel VH (2001) *Biomecânica Básica do Sistema Musculoesquelético*. 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Pawlina WR (2016) *Histologia texto e atlas – correlações com Biologia celular e molecular* (7ª ed.). Guanabara Koogan.

Pereira LAVD, Consonni SR, Costa CFP (2019) Histologia óssea para perioimplantodontistas – parte 2. *ImplantNewsPerio*;4(3):642-4.

Pereira LAVD, Consonni SR, Costa CFP (2019). Histologia óssea para perioimplantodontistas – parte 1. *ImplantNewsPerio*;4(3):642-4.

Ribeiro A, Gemini-Piperni R, Travassos R, Lemgruber L, Silva RC, Rossi AL, Farina M, Anselme K, Shokuhfar T, Shahbazian-Yassar R, Borojevic R, Rocha, LA, Werckmann J, Granjeiro, JM (2016) Trojan-Like Internalization of Anatase

Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells. *Scientific Reports*, 6, 23615.

Rocha AL, Bighetti-Trevisan RL, Duffles LF, Arruda JAA, Taira TM, Assis BRD, Macari S, Diniz IMA, Beloti MM, Rosa AL et al (2020) Inhibitory effects of dabigatran etexilate, a direct thrombin inhibitor, on osteoclasts and osteoblasts. *Thrombosis Research*; 186, 45–53.

Romanos G (2015) Current concepts in the use of lasers in periodontal and implant dentistry. *J Indian Soc Periodontol*; 19, 490.

Sawa N, Fujimoto H, Sawa Y, Yamashita J (2019) Alternating Differentiation and Dedifferentiation between Mature Osteoblasts and Osteocytes. *Scientific Reports*; 9, 13842.

Schoichet JJ, Mourão CFAB, Fonseca EM, Ramirez C, Villas-Boas R, Prazeres J, Quinelato V, Aguiar TR, Prado M, Cardarelli A, Mello-Machado R, Casado P (2021) Epidermal Growth Factor Is Associated with Loss of Mucosae Sealing and Peri-Implant Mucositis: A Pilot Study. *Healthcare*, 9, 1277.23.

Senna P, Cury AADB, Kates S, Meirelles L (2015) Surface damage on Dental Implants with Release of loose particles after Insertion into Bone. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 17, 681–692.

Souza W, Piperni SG, Laviola P, Rossi AL, Rossi MID, Archanjo BS, Leite PE, Fernandes MH, Rocha LA, Granjeiro JM, Ribeiro AR (2019) The two faces of titanium dioxide nanoparticles bio-camouflage in 3D bone spheroids. *Scientific Reports*, 9, 9309.

Tuan RS, Lee FYI, Konttinen YT, Wilkinson MJ, Smith, RL (2008) What are the local and systemic biologic reactions and mediators to wear debris, and what host factors determine or modulate the biologic response to wear particles? *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 16, S42–S48.

Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD (2006) The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*. v. 17, n.3, p. 319-336.

Virtanen S, Milošev I, Gomez-Barrena E, Trebše R, Salo J, Konttinen YT (2008) Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions. *Acta Biomaterialia*, v. 4, n. 3, p. 468–476.

Yamada Y, Okano T, Orita K, Makino T, Shima F, Nakamura H (2022) 3D-cultured small size adipose-derived stem 571 cell spheroids promote bone regeneration in the critical-sized bone defect rat model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 603, 57–62.

Yuste I, Luciano FC, González-Burgos E, Lalatsa A, Serrano DR (2021) Mimicking bone microenvironment: 2D and 3D in vitro models of human osteoblasts. *Pharmacological Research*; 169, 105626.

ARTIGO PUBLICADO (em anexo)



Article

The Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Osteoblasts Mineralization: A Comparison between 2D and 3D Cell Culture Models

Gabriela de Souza Castro ^{1,†}, Wanderson de Souza ^{2,†}, Thais Suelen Mello Lima ², Danielle Cabral Bonfim ³, Jacques Werckmann ⁴, Braulio Soares Archanjo ⁵, José Mauro Granjeiro ², Ana Rosa Ribeiro ⁶ and Sara Gemini-Piperni ^{1,7,*}

¹ Postgraduate Program in Odontology, Unigranrio, Duque de Caxias 25071-202, Brazil

² Directory of Life Sciences Applied Metrology, National Institute of Metrology Quality and Technology, Rio de Janeiro 25250-020, Brazil

³ LabCeR Group, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21941-901, Brazil

⁴ Visitant Professor at Brazilian Center for Research in Physics, Rio de Janeiro 22290-180, Brazil

⁵ Materials Metrology Division, National Institute of Quality and Technology, Rio de Janeiro 25250-020, Brazil

⁶ NanoSafety Group, International Iberian Nanotechnology Laboratory, 4715-330 Braga, Portugal

⁷ Laben Group, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21941-901, Brazil

* Correspondence: sara.gemini@hotmail.com

† These authors contributed equally to this work.



Citation: de Souza Castro, G.; de Souza, W.; Lima, T.S.M.; Bonfim, D.C.; Werckmann, J.; Archanjo, B.S.; Granjeiro, J.M.; Ribeiro, A.R.; Gemini-Piperni, S. The Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Osteoblasts Mineralization: A Comparison between 2D and 3D Cell Culture Models. *Nanomaterials* **2023**, *13*, 425. <https://doi.org/10.3390/nano13030425>

Academic Editors: Andrea Hartwig and Christoph Van Thriel

Received: 30 December 2022

Revised: 12 January 2023

Accepted: 16 January 2023

Published: 20 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Although several studies assess the biological effects of micro and titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs), the literature shows controversial results regarding their effect on bone cell behavior. Studies on the effects of nanoparticles on mammalian cells on two-dimensional (2D) cell cultures display several disadvantages, such as changes in cell morphology, function, and metabolism and fewer cell–cell contacts. This highlights the need to explore the effects of TiO₂ NPs in more complex 3D environments, to better mimic the bone microenvironment. This study aims to compare the differentiation and mineralized matrix production of human osteoblasts SAOS-2 in a monolayer or 3D models after exposure to different concentrations of TiO₂ NPs. Nanoparticles were characterized, and their internalization and effects on the SAOS-2 monolayer and 3D spheroid cells were evaluated with morphological analysis. The mineralization of human osteoblasts upon exposure to TiO₂ NPs was evaluated by alizarin red staining, demonstrating a dose-dependent increase in mineralized matrix in human primary osteoblasts and SAOS-2 both in the monolayer and 3D models. Furthermore, our results reveal that, after high exposure to TiO₂ NPs, the dose-dependent increase in the bone mineralized matrix in the 3D cells model is higher than in the 2D culture, showing a promising model to test the effect on bone osteointegration.

Keywords: TiO₂ NPs; titanium dental implants; 3D spheroids; osteoblasts

1. Introduction

The development of nanotechnology is increasing exponentially, especially in the production of biomaterials for dental implants [1–3]. This market moved around US\$10.87 billion in 2021 and could reach US\$12.49 billion in 2022 [1,4]. In this scenario, titanium (Ti) is the metallic material most commonly used for implant applications due to its excellent biocompatibility and osteointegration properties [2,5]; however, the failure of dental implants continues to increase [6]. Although the causes are multifactorial and often related to microbial colonization (biofilms), new questions have been raised about the role of corrosion and/or wear process in the progress of implant failure [7]. Recently, Ti-like particles (mainly titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs)) have been found in the peri-implant mucosa and bone cells [6,8,9].

Prosthesis degradation processes occur in all material classes, with degradation by-products known to be hazardous. Nonetheless, nanoscale metallic debris released are of tremendous concern since they exhibit enhanced toxicity and dissolving capacities, compared with micron-size polymeric and ceramic debris [7]. Micromovements between the implant abutment and the bone or mucosa unavoidably lead to mechanical wear of the material (formation of nano and micro-sized debris), which in a corrosive environment result in the release of metallic ions [7,10–12]. Biologically, this event is related to macrophage activation [7,10,11,13] and the onset of pro-inflammatory response, with the release of cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the peri-implant area, which culminates in reduced osteoblastogenesis, increased osteoclastogenesis, and bone loss in the periprosthetic region [11,13]. Bone loss limits the ability of a prosthesis to withstand physiological loads, giving rise to a need for revision surgery.

Many *in vitro* and *in vivo* studies have shown that titanium particles induce pro-inflammatory and toxic effects in the peri-implant environment [7,14–17]. However, some *in vitro* studies also suggest that TiO₂ NPs can stimulate bone formation [2,18]. Thus, controversy remains about the actual role of TiO₂ NPs on bone cells, likely due to the two-dimensional *in vitro* models used.

It has been widely reported that 2D osteoblast cell cultures [13–17,19] may lose their original tissue organization and polarity and have limited protein–protein interactions [2,18]. They may exhibit integrins and changes in the cytoskeletal organization that alter their original morphology [2,18,20]. In addition, cells grown in a 2D monolayer often exhibit altered metabolism, phenotype, and gene expression, and the interactions between cells and the extracellular matrix are different from *in vivo* tissues, which have a three-dimensional architecture [2,20]. In contrast, 3D culture models exhibit greater cell–cell and cell–matrix interactions, which are closer to the *in vivo* model [21]. Moreover, cellular polarity, which is important for cellular organization and functionality, remains unaltered [2,21,22]. Therefore, surface receptors can bind to extracellular matrix proteins, activate cellular biochemical signals, and influence cell proliferation, differentiation, and mineralization [2,21].

Therefore, in this work, the effects of TiO₂ NPs on the differentiation and production of a mineralized matrix of human osteoblasts cultured in monolayer (2D) and osteoblast-like spheroid culture models (3D) were investigated. Cell viability, morphology, differentiation, mineralization, and nanoparticle internalization were investigated after exposure to NPs. Results demonstrate that TiO₂ NPs lead to a dose-dependent increase in mineralization, although these TiO₂ NPs are clinically known for their possible immune system activation.

2. Materials and Methods

Titanium anatase dispersion: TiO₂ NPs (SIGMA, Kanagawa, Japan) with primary particle size < 25 nm and surface area of 45–55 m²/g were suspended in ultrapure water (2 mg/mL; pH 4) and dispersed using a direct ultrasound (Q-Sonica) equipped with a 19 mm tip. The sonication was carried out in an ice bath at 32 W of acoustic delivery power for 15 min with 8 s (pulse mode on) and 2 s (pulse mode off), following a protocol previously described by the group [2,5]. After 24 h of stabilization, particle size and particle agglomeration (zeta potential analysis (ζ (mV)) and the polydispersion index (PDI)) were determined by dynamic light scattering (DLS, Zeta-Sizer Nano ZS, Malvern Instruments GmbH, Malvern, UK). DLS measurements were performed at 25 °C using 10 mm polystyrene disposable cuvettes.

To confirm particle size in the medium culture, titanium particles were alternatively suspended in high glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1 mg/mL bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to avoid particle re-agglomeration.

Cell culture: The human osteoblast cell line (SAOS-2) was supplied by the Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil) packed in frozen ampoules and kept in liquid nitrogen. Cells were thawed and expanded into cell culture flasks (Corning)

with DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (PS—10,000 units/mL of penicillin and 10,000 µg/mL of streptomycin) (PS, Gibco) in a humidified incubator (5% CO₂, 37 °C). Cell contamination with bacteria, fungi, or mycoplasma was analyzed as previously reported [2,5]. For the 2D model, 10,000 cells/well were seeded in standard flat-bottom 96-well plates for 24 h.

3D culture: For 3D spheroid formation, 96-well U-bottom plates (Corning, Corning, NY, USA) were coated with a thin layer of 1% ultrapure agarose (Sigma-Aldrich), and 10,000 cells were seeded in each well in 200 µL DMEM high glucose medium supplemented with 10% FBS and 1% PS and then incubated for 3 days. Cell growth, shape, and morphology were analyzed on an inverted optical microscope (Nikon Eclipse, Tokyo, Japan), following a protocol previously described [2].

3D cell cytoskeleton: Spheroids were washed with 0.01 M PBS and then fixed with 4% paraformaldehyde (PFA). The cell membrane was then permeabilized by incubation for 2 h with 0.2% BSA + 0.1% Triton X-100 in 0.01 M PBS for 2 h at room temperature (RT). The spheroids were washed three times with a blocking solution containing 50 nM NH₄Cl in 0.01 M PBS. Phalloidin solution (500 ng/mL, stock 1:40, ThermoFisher Lot: F432) diluted in 0.2% BSA + 0.1% Triton X-100 in 0.01 M PBS was then added and incubated for 2 h, and later an additional 30 min with DAPI (1:500) (SIGMA-ALDRICH—Lot: 583-93-7). Cell morphology was visualized using a confocal fluorescence microscope (DMI 6000, Leica, Teaneck, NJ, USA).

NPs exposition: Both 2D and 3D cell cultures were exposed to 0, 5, and 100 µg/mL TiO₂ NPs suspended in incomplete osteogenic medium composed of DMEM supplemented with 10% FBS, 50 µg/mL of ascorbic acid (Sigma), 100 mM of β-glycerophosphate (Sigma), and antibiotics for 3 and 21 days. Cells without TiO₂ NPs treatment were used as control.

Cytotoxicity assay: After NPs exposition, the cells were washed three times with 0.01 M PBS and then incubated with 0.125% Trypsin (kept in a humidified incubator with 5% CO₂, 37 °C) for 5 min. Trypsin was blocked by adding culture medium with 10% FBS, and 2D adherent cells and 3D spheroids were mechanically dissociated. The cells were centrifuged for 7 min at 500 × g (4 °C), and the pellet was resuspended in 100 µL annexin-binding buffer (Dead Cell Apoptosis Kit for Annexin V; Kit Life and Dead, Life Technologies). The samples were incubated for 15 min (RT) in 3 µL annexin/fluorescein (FITC) solution and 1 µL propidium iodide (according to the manufacturer's instructions). All analyses were performed in a flow cytometer (FACS Aria III, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

Morphology analysis: Cells were washed with 0.01 M PBS and processed for scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy. Briefly, cells were fixed using modified Karnovsky (2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2) for 2 h at RT and washed with 0.1 M cacodylate buffer. The samples were post-fixed with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer (1:1) for 30 min in the dark, then washed with cacodylate buffer and dehydrated in ethanol (VETEC—1567). Then, for TEM analysis, samples were contrasted in a bloc with 1% of uranyl acetate, dehydrated in acetone, and embedded in Spurr. Ultra-thin sections were also analyzed using EDS in scanning transmission electron microscopy (STEM) mode in a TITAN 80–300 electron microscope (FEI, Netherlands (300 kV).

Alternatively, for SEM analysis, the cells were dried at a critical point (Autosamdri®-815, Series A) and metalized with gold (in a current of 40 mA for 90 sec). The 2D cell samples were analyzed in a scanning electron microscope (JEOL Field Emission Gun-JSM-7401F) with an acceleration voltage of 1 kV. The 3D cells were analyzed under a helium ion beam microscope (HIM) (Carl Zeiss Orion Nanofab—beam current of 0.8 pA, using an electron flood gun to compensate for the positive charge).

Differentiation and analysis of the cell matrix: Cell differentiation was evaluated by alkaline phosphatase histochemistry. The cells were cultured at different times (3, 7, and 21 days). The alkaline phosphatase labeling kit (Sigma-Aldrich Lot: APF-1KT) was used, which is based on the application of 500 µL of diazonium and naphthol salt solution for

30 min in the dark. Afterward, the reaction was stopped with tridistilled water. Positive cells marked in red were photographed under an inverted optical microscope (Nikon Eclipse TS100), using the photo program (Leica Applications Suites—LAS EZ).

To evaluate the production of the mineralized matrix, alizarin red staining was performed after 3, 7, and 21 days of culture. Cells were fixed with 4% PFA and exposed to 1% alizarin red solution (Sigma-Aldrich) at RT for 30 min, then rinsed with ultrapure water. To quantify matrix mineralization, alizarin red-positive nodules were dissolved in a solution of 0.5 N HCl with 5% SDS. The optical density (OD) values of absorbance were quantified spectrophotometrically at a wavelength of 450 nm using a microplate reader (Biotek Synergy 2 multi-mode detection with gen5 software).

Statistical analysis: Data were presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). The Gaussian distribution of the samples was tested, and the statistical significance of the data was evaluated using one-way ANOVA or unpaired *t*-tests. The *p* values are shown in the figures and statistical significance was considered when *p* < 0.05. Each experiment was performed three times, with triplicates.

3. Results

3.1. Characterization of TiO₂ NPs

TiO₂ NPs with a primary size of 25 nm were used to mimic the wear particles released by dental implants. The physicochemical characterization of the primary TiO₂ NPs was already published [2,5]. TEM micrographs revealed that TiO₂ NPs in ultrapure water were agglomerated, requiring the implementation of a dispersion protocol (Figure 1A). Dark-field STEM images show the morphology and agglomeration of TiO₂ NPs after dispersion (direct probe sonication), and the STEM/EDS Ti-K map (in blue) confirmed the identity of the TiO₂ NPs (Figure 1B). DLS analysis (Figure 1C) showed that the mean diameter (DH (nm)) of the TiO₂ NPs was 135 ± 24 nm in water and increased significantly (*p* < 0.05, unpaired *t*-test) in cell culture medium (156 ± 14 nm), maintaining a polydispersion index (Pdl) of less than 0.2. Finally, the zeta potential analysis (ζ (mV)) in water and culture medium showed a significant decrease in the zeta potential value after medium contact, indicating the formation of protein and ionic corona on TiO₂ NPs surface (*p* < 0.05, unpaired *t*-test) (Figure 1C).

3.2. Effect of TiO₂ NPs on the Morphology of 2D and 3D Human Osteoblasts

In this study, human osteoblasts (SAOS-2) were cultured as monolayers or spheroids. After 72 h of seeding, cells were exposed for 72 h to 100 μ g/mL of TiO₂ NPs. Optical microscopy images show the conventional SAOS-2 morphology (Figure 2A, left panel). In monolayers, the cells exhibit an epithelial-like phenotype, which is maintained after exposure to TiO₂ NPs. SAOS-2 spheroids have a round shape with a well-organized cytoskeleton (Figure 2B,C), also maintaining their morphology upon titanium exposure (Figure 2C). However, a 29% increase (*p* = 0.0151, unpaired *t*-test) in diameter and volume was observed after exposition to TiO₂ NPs (Figure 2D).

To confirm whether ultrastructural changes occurred after treatment with TiO₂ NPs, scanning electron microscopy (SEM) analysis was performed and showed that SAOS-2 in 2D and spheroids (3D) maintained their morphology after 3 days of exposure to TiO₂, without changes in their cell–cell contact (Figure 3A,B). Moreover, SEM-EDS analysis confirmed the presence of TiO₂ NPs on the surface of both cell models. A detail of interaction of TiO₂ NPs with spheroids (Ti-k, marked in blue) can be observed in Figure 3C.

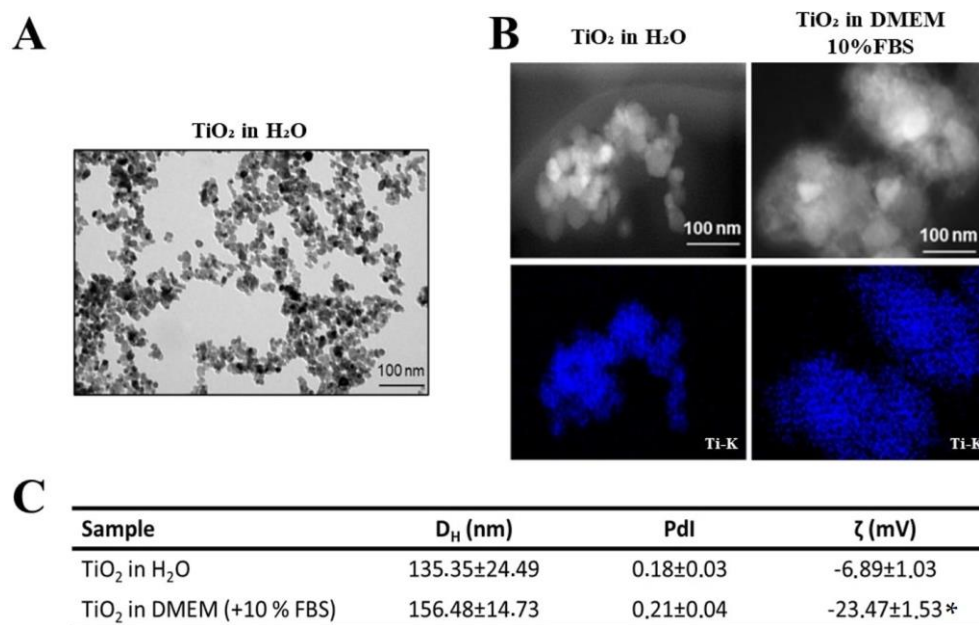


Figure 1. Characterization of TiO₂ NPs: (A) Transmission electron micrographs (TEM) of TiO₂ NPs in ultrapure water without dispersion. (B) Dark-field STEM micrographs of TiO₂ NPs after dispersion in water and cell culture medium and STEM/EDS Ti-K map confirming titanium presence (in blue). Scale bar: 100 nm. (C): Hydrodynamic diameter (D_H (nm)) and polydispersity index (PDI) of TiO₂ NPs after dispersion in ultrapure water and cell culture medium obtained by dynamic light scattering (DLS) and analysis of surface charge by zeta potential of TiO₂ NPs (ζ (mV)) in water and culture medium. The results represent the mean ± standard deviation of three independent experiments performed in triplicate of measurement (* *p* < 0.05 vs. TiO₂ NPs in water).

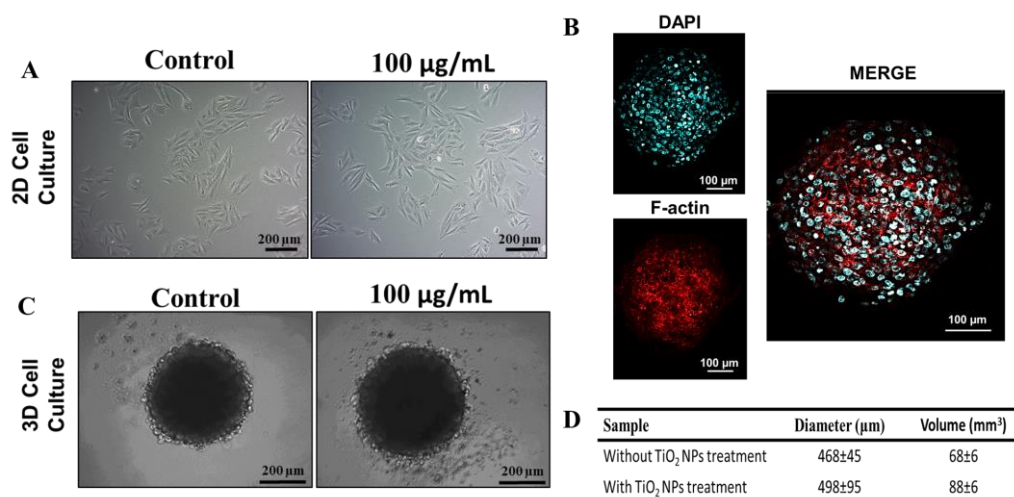


Figure 2. Treatment of TiO₂ NPs in 2D and 3D cultures of human osteoblasts (SAOS-2): (A) Phase contrast micrograph of SAOS-2 in 2D with or without 100 µg/mL of exposition to TiO₂ NPs for 72 h (scale bar: 200 µm) (B) Spheroid cytoskeleton (3D), nucleus in blue (stained with DAPI) and the actin filaments in red (stained for F-actin) (scale bar: 100 µm). (C) Phase contrast micrograph of SAOS-2 in 3D with or without 100 µg/mL of exposition to TiO₂ NPs for 72 h (scale bar: 200 µm). (D) Average diameter and volume of spheroids. The baseline condition was used as a control. The results are representative images of three independent experiments.

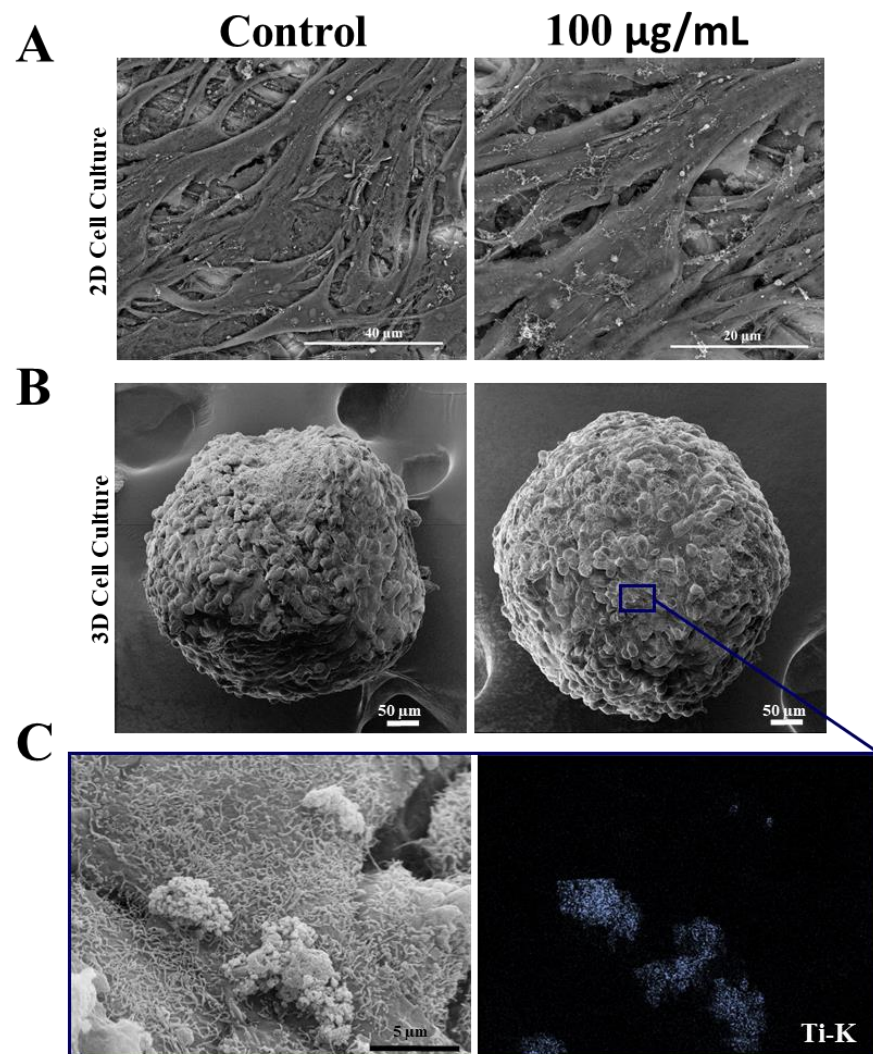


Figure 3. Morphology of human osteoblasts (SAOS-2) cultured in 2D and 3D after exposure to TiO_2 NPs: (A) Scanning electron micrographs showing SAOS-2 cultured in 2D and in spheroids (B) after treatment with 100 $\mu\text{g/mL}$ of TiO_2 NPs for 3 days. (C) STEM/EDS Ti-K map analysis. Ti showed in blue point interacting with cells. Control: cultivation without NPs. The results are representative images of three independent experiments. (scale bar: 40 μm , 20 μm , 50 μm and 5 μm).

3.3. Effect of TiO_2 NPs on Human Osteoblast Viability

Flow cytometry analysis with PI/annexin after 3 and 21 days of culture did not show TiO_2 NPs cytotoxicity, both in the monolayer (Figure 4A) and in the spheroids models (Figure 4B). The levels of apoptosis and necrosis were similar in all conditions evaluated.

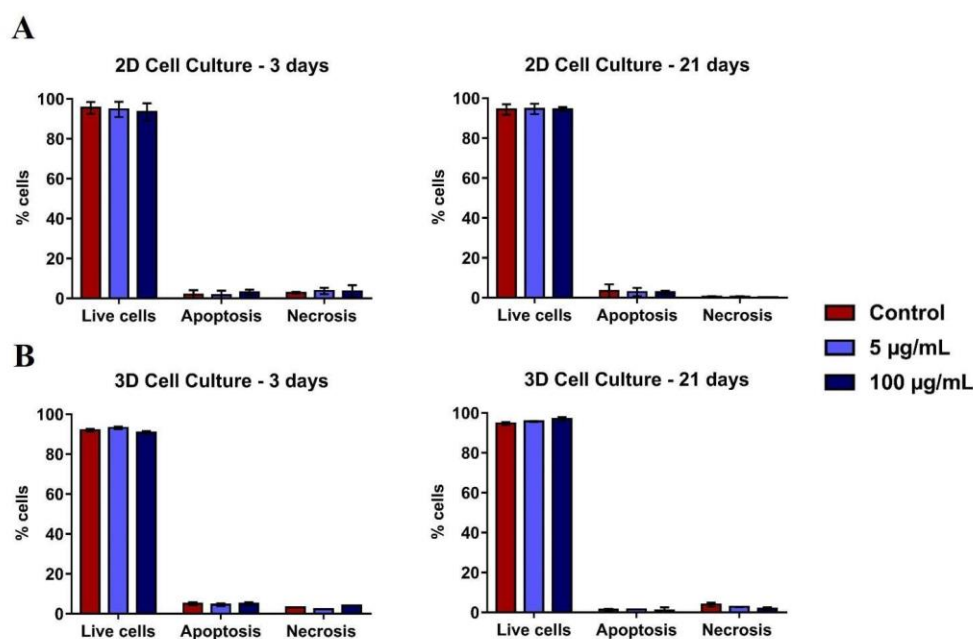


Figure 4. Viability of 2D and 3D human osteoblasts (SAOS-2): SAOS-2 were exposed to TiO₂ NPs (100 µg/mL) for 3 and 21 days and the PI/Annexin assay was performed by flow cytometry of cells in (A) 2D and (B) 3D. The baseline condition was used as a control. The results are the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments (no statistical difference).

3.4. Internalization of TiO₂ NPs in 2D and 3D Culture of Human Osteoblasts

Transmission electron microscopy (TEM) showed, both in 2D and 3D models, the internalization of TiO₂ NPs, that preferentially located in the cell cytoplasm within membrane-like-vesicles or after cell-membrane disruption, possibly in multivesicular bodies (MVBs) or auto-phagolysosomes delimited by the membrane (Figure 5).

3.5. Differentiation and Mineralization of Human Osteoblasts after Exposure to TiO₂ NPs

To understand the influence of TiO₂ NPs on the differentiation and mineralization of both cell models (2D and 3D), analyses of alkaline phosphatase (ALP) (differentiation marker) and alizarin red (mineralization marker) were performed. For these analyses, osteoblasts were cultured for up to 14 days, and two exposure concentrations (5 and 100 µg/mL) of TiO₂ NPs were used. Previous data in human primary osteoblasts 2D histochemical micrographs showed that the treatment of TiO₂ NPs did not enhance the labeling for ALP (marked in red) after 14 days of culture (Figure S1A). However, in the mineralization analysis, there was a dose-dependent increase in alizarin staining after 14 days of treatment with 100 µg/mL (marked in intense red) compared to the control (Figure S1B).

To compare differences in mineralization occurring in 2D and 3D models, we performed alizarin staining after 3, 7, and 14 days after 5 µg/mL or 100 µg/mL TiO₂ NPs exposure in both models. Alizarin red results showed a significant dose-dependent increase in mineralization at 14 days compared to the control, both in 2D (Figure 6A) and 3D (Figure 6B). Moreover, when treatment values are normalized by control values, the mineralization increase is higher in the 3D model when compared with the 2D model, suggesting that both models can present different results in the mineralization evaluation (Figure 6C and representative images in Figure 6D).

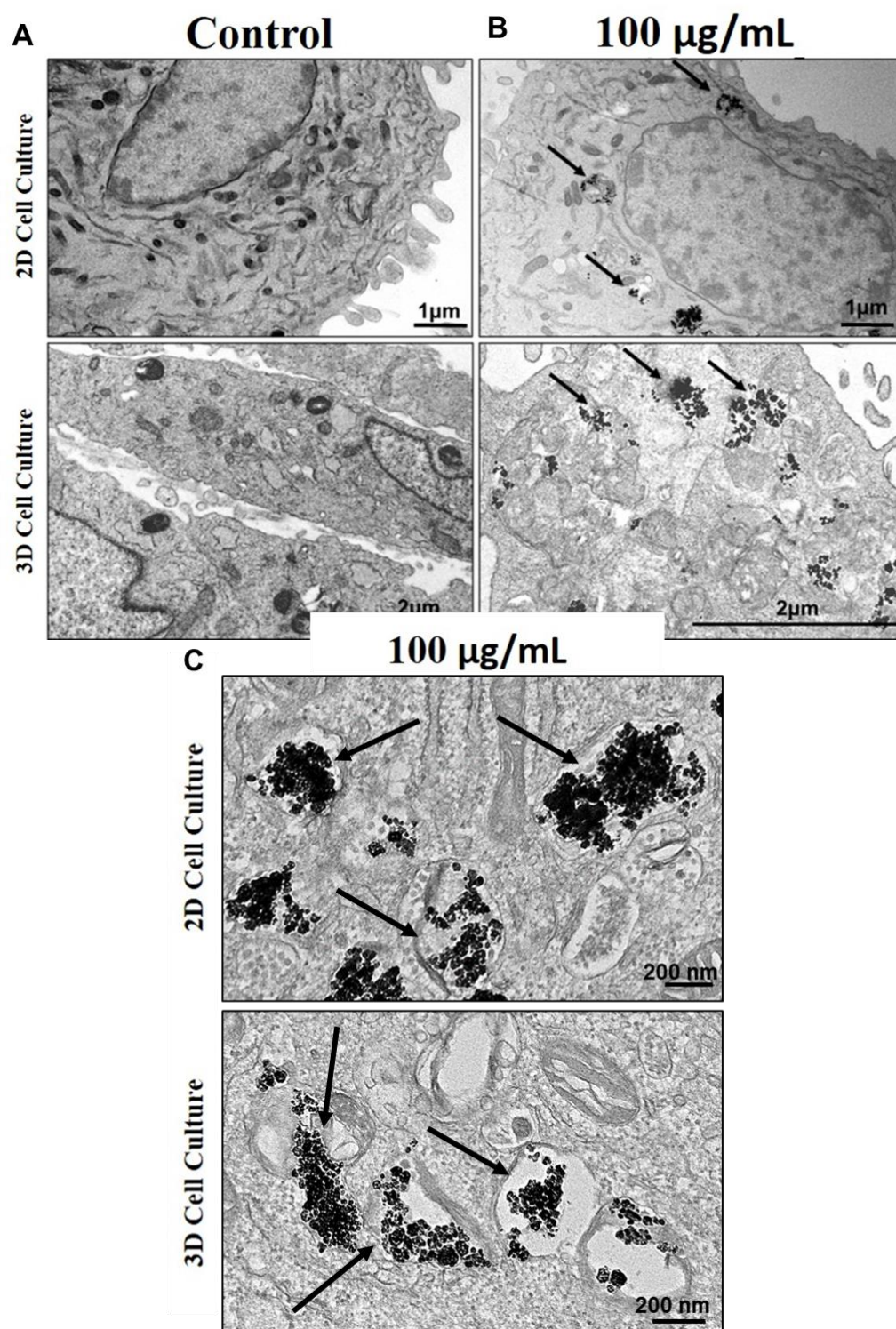


Figure 5. Internalization of TiO₂ NPs: Transmission electron microscopy (TEM) micrographs showing TiO₂ NPs internalization in human osteoblasts (SAOS-2) 72 h cultured: (A) control, cultured without NPs or (B,C) treated with 100 µg/mL of TiO₂ NPs (black arrow). The results are representative images of three independent experiments. (scale bar: 1 µm, 2 µm, and 200 nm).

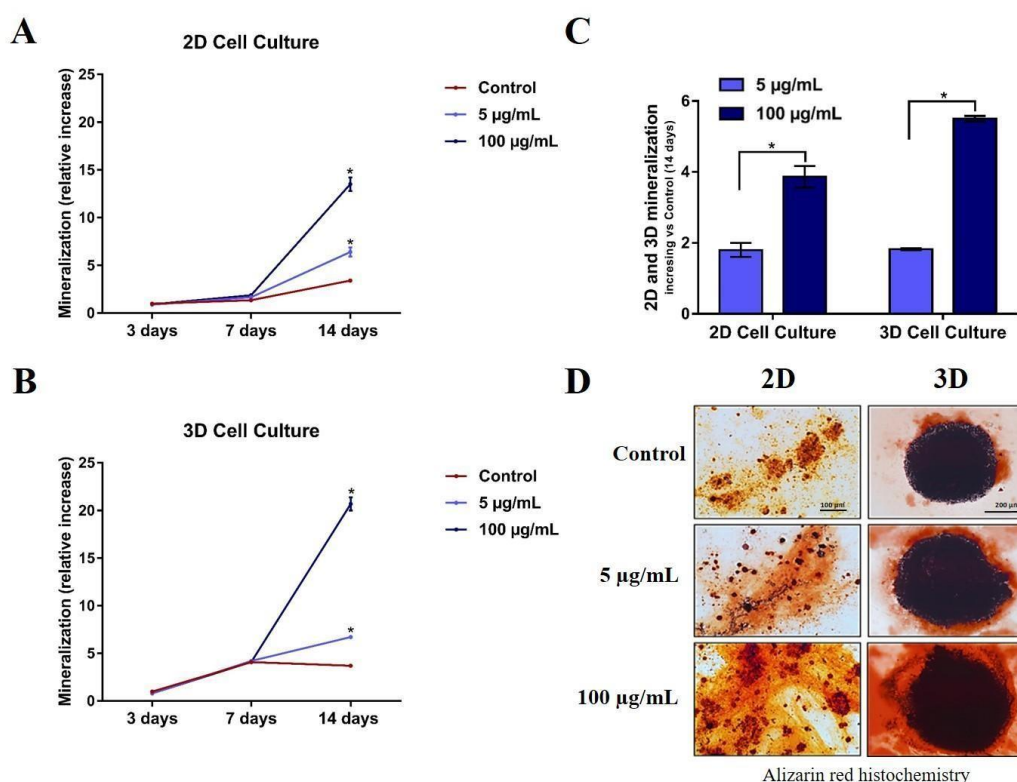


Figure 6. Mineralized matrix produced by human osteoblasts (SAOS-2) in 2D and 3D cells exposed to TiO_2 NPs (0, 5 and 100 $\mu\text{g/mL}$) during 3 and 14 days in osteogenic medium. Alizarin red assay shows a dose-dependent matrix production in (A) 2D SAOS-2 model and (B) 3D SAOS-2 models. The graphics in (C) present a comparison between the inorganic matrix production on both 2D and 3D models at 14 days (final experimental time) normalized *vs* each control to show dose-dependent mineralization fold increase in the different models. The results are average $\pm$ standard deviation of three independent experiments * $p < 0.05$; (D) representative images obtained through optical microscopy.

4. Discussion

Titanium is the main material employed in the dental implant industry, due to its high mechanical strength, low elastic modulus, corrosion resistance, ductility, and biocompatibility [6,9]. However, tribocorrosion processes at the implant surface lead to accelerated bone loss, compromising osseointegration, and increasing periprosthetic failure [2,5–9,23,24]. The hostile electrolytic environment (oxidation/reduction) together with mechanical action at the interface enables the tribocorrosion phenomena [7,10]. As a consequence, degradation products (released from implants) including metal ions, micrometric, and/or nanometric metallic debris (TiO_2 NPs) can be internalized by cells in the bone niche, possibly generating cytotoxic effects [6,9,10]. The adverse effects of TiO_2 NPs vary widely in the literature, which raises concern among authorities and physicians due to their high prevalence [5,10,17]. Literature data reveal that inflammatory stimuli associated with cytokine overproduction and increased production of reactive oxygen species are referred to as primary toxic effects that lead to cell death [6,9,13,17].

Some authors explained that this mechanism leads to activation of immunological sentinels and accumulation of antigens such as ions, nanoparticles, microparticles, and bacterial antigens via the functional interface between dental implant and tissue. This leads to immunological cell polarization and follows dental implant loss [6,9].

Most available studies that evaluate osteoblast response to TiO_2 NPs use 2D cell culture models, which have shown limitations regarding cell growth and cell–cell and cell–matrix interactions, among others [25–28]. Few studies evaluate the influence of TiO_2 NPs on the

physiology of bone cells grown in 3D models such as spheroids [2]. Osteoblast spheroids can be considered as a culture model that better mimics living cells in terms of structural and biofunctional properties and provides more reliable results compared to conventional 2D cell cultures (Figure 7) [2,25,29]. Despite this, there are some limitations to spheroid culture, mainly because cellular environments are not similarly exposed to the culture medium. This can lead to the formation of a microenvironment inside the spheroids that can select groups of cells [30,31]. Partial diffusion of nutrients or oxygen can induce necrotic areas in the central area of the spheroids [32]. However, well-characterized multicellular spheroids exhibit different levels of extracellular matrix deposition, growth factor secretion, and gene expression profiles [2]. The viability, morphology, and gene expression of osteoblastic spheroids are contact-dependent, and single or co-culture spheroids have been shown to have an impact on bone cell function [33]. Interestingly, a study reported that primary osteoblasts and pre-osteoblasts MC3T3-E1 can differentiate into osteocytes when grown in 3D cultures [34]. Therefore, 3D culture models can be used to study the pathophysiological reactions of TiO₂ NPs in bone metabolism compared to 2D cultures. A previous study by W. Souza et al., on the cytotoxicity effect of TiO₂ NPs on osteoblast spheroids, revealed that 72 h exposition to TiO₂ NPs can alter the cell cycle, without interfering with osteoblasts' ability to differentiate and mineralize and significantly increase collagen and pro-inflammatory cytokine secretion [2]. In the present study, a longer exposure period (21 days) was assessed to compare 2D with 3D osteoblasts models to better understand their relevance for nanotoxicological studies.

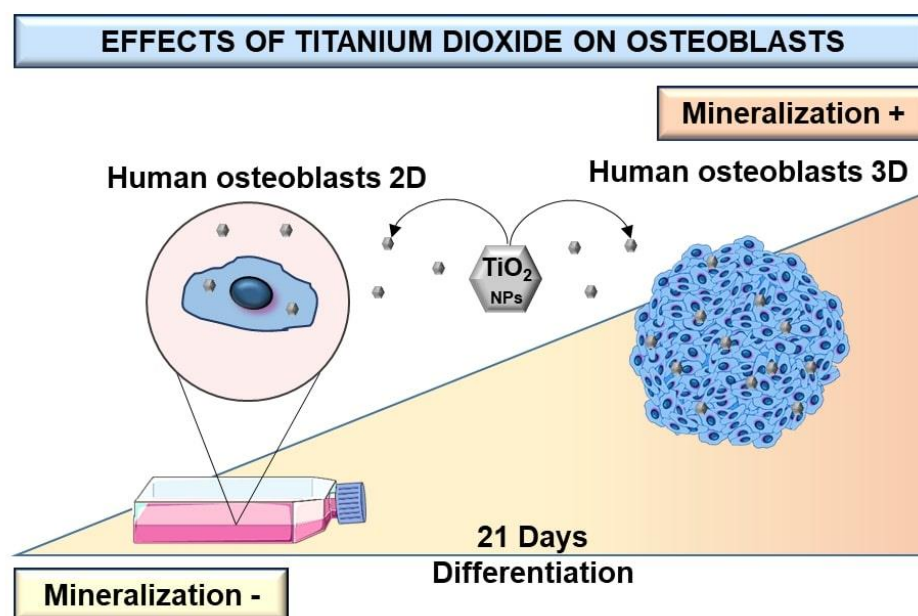


Figure 7. Scheme of differentiation and production of a mineralized matrix of human osteoblasts SAOS-2 cultured in monolayer and 3D spheroid cell models after exposition to TiO₂. After high TiO₂ NPs exposure, the dose-dependent increase of bone-mineralized matrix in the 3D cells model is higher than in monolayer (2D) culture.

TiO₂ NPs are chemically stable, have antibacterial properties, and induce less toxicity than other nanostructures, and, when exposed to the biological environment, blood plasma proteins and ions selectively adsorb on the outer surface of the cell [35]. The complex interface depends on the physical and chemical characteristics of the NPs, as well as the biological characteristics of the environment [36]. In the present study, we observed that TiO₂ NPs had an average size of 150 nm in the culture medium. We can notice an increase in the average size after the addition of the culture medium due to the adsorption of proteins and ions on the TiO₂ NPs surface, which can be correlated with the change in surface charge, identified by zeta potential analysis. Furthermore, in our previous study,

we confirmed the adsorption of calcium and phosphate on the surface of TiO₂ NPs, which are important mediators of bone mineralization [5].

To understand the influence of TiO₂ NPs on bone cell mineralization, we used a mature osteoblast line, cultured both in monolayer (2D) and spheroids (3D), the former characterized previously [2]. Spheroids and monolayer cells were treated with 100 µg/mL of NPs for 21 days. In both models (2D and 3D), we observed the internalization of TiO₂ NPs in membrane vesicles (with 72 h). Some studies have shown that NPs can be internalized in a dose-dependent manner, accumulating preferentially in the perinuclear region, and having as their final destination the lysosomes [35,37]. Normally TiO₂ NPs are not observed dispersed in cell cytoplasm [5,35,37]. However, the effect of TiO₂ NPs on cells is directly related to their size distribution, crystal structure, as well as corona formation [35]. Recently, the formation of a bio-camouflage rich in calcium, phosphorus, and hydroxyapatite crystals around TiO₂ NPs was demonstrated, which is known to facilitate the internalization in 2D and 3D osteoblastic models since the detected chemical elements are essential for bone cell metabolism and mineralization [2,5,38].

The present study demonstrated that TiO₂ NPs did not alter the viability of osteoblasts in both cell models (with 21 days). Concomitantly, they did not change the osteoblast morphology or spherical shape of the 3D model upon internalization of the NPs. Interestingly, they were able to stimulate an increase in calcium deposition, which is indicative of the activation of a mineralization process in osteoblastic spheroids. In the present study, results of alkaline phosphatase synthesis and calcium labeling demonstrated that TiO₂ NPs increased osteoblast differentiation that induced greater mineralization in a 3D culture model, suggesting that the 3D architecture possibly increases cell surface interaction with previously reported TiO₂ NPs bio-camouflaged [2]. The mineralization increase in 3D models after exposure to NPs may be related to the greater cell surface capable of contacting NPs when compared to the monolayer (2D), enhancing the stimulatory effects of TiO₂ NPs [39]. This is consistent with previous studies that reveal that 3D osteoblasts models when exposed to TiO₂ NPs, compared to monolayer cells, induce the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF), activating a cascade of events resulting in higher type I collagen production [39–43]. Bone mineralization is the first step for implant osseointegration and begins when collagen I acts as a three-dimensional scaffold for hydroxyapatite deposition [44]. Another study reported greater osteogenic differentiation when using 3D collagen gel culture [34]. Studies also showed that the 2D cell model does not yet seem to be the better model to study interaction with NPs; instead, the spheroids are also promising for application to 3D bioprinting tissue models with biomaterial scaffolds, as an innovative technology to improve bone osteointegration [45].

Unfortunately, there is no consensus in the literature on how to evaluate the biological effect of TiO₂ NPs. Without standardized protocols to assess the biological impacts of NPs, it is necessary to validate safe assessments and mitigate potential health impacts, moving toward the evaluation and development of new cellular study models to better mimic the biological environment [37]. Although osteoblastic spheroids have their advantages compared to monolayers—such as reproducibility, better nutrients, oxygen diffusion gradients, improved cell–cell interactions, matrix deposition, and models with various cell stages (proliferating, quiescent, apoptotic, hypoxic, and necrotic cells) [46,47], 3D spheroid models have not been validated as realistic *in vitro* models [29,46,48]. One of the main drawbacks of spheroids is that the porosity and mechanical properties is difficult to be studied. Thus, efforts should be made to improve 3D bone cell models to recapitulate the bone microenvironment that is known to be constituted by different cell types and has dynamic and metabolic activity.

TiO₂ NPs released from dental implants are, on the one hand, considered the cause of clinical peri-implant bone loss; on the other hand, they may be able to stimulate the production of a mineralized extracellular matrix in osteoblast spheroids [48]. Another important aspect is that spheroids can respond physiologically better to the stimuli of TiO₂ NPs, which corroborates the development of new studies to create new models applied

in clinical studies, to favor the process of bone remodeling and alternative treatment for periodontitis and peri-implantitis. In addition, the spheroids themselves can be applied to high-cell-density tissue models, innovative technology for bone augmentation, and soft tissue replacement procedures [45]. Therefore, the combination of TiO₂ NPs with spheroid cells should be an interesting approach for tissue reconstruction.

Lastly, our results demonstrate that TiO₂ NPs increase calcium deposition in 3D versus 2D cultures. Although this study revealed interesting findings regarding the behavior and role of TiO₂ NPs in generating stimuli for mineralization in 3D models only, it should be noticed that our results are limited to the conditions tested and the experimental setup. Further studies should be encouraged, and further evaluations using the quantification of genes that act on differentiation and mineralization should be performed. However, our results help to better understand the possible impact of 3D culture in dentistry, and also open a discussion about the dual role of TiO₂ NPs, which on one side can activate an inflammatory response that leads to bone resorption. However, on the other hand, it is activating mineralization. Our findings are considered clinically relevant, since, for the first time, we report that at the bone-implant interface, TiO₂ NPs besides the activation of macrophages can also stimulate osteoblasts that play a fundamental role in the mineralization process.

5. Conclusions

In this study, the cells were exposed to TiO₂ NPs at concentrations up to 100 µg/mL in 2D and 3D models for up to 21 days of exposure.

TiO₂ aggregates were dispersed to nanometric size and characterized successfully. Its internalization in both cell models showed no differences in cell morphology or viability and bone mineralization induction in a dose-dependent form in both culture models.

However, the mineralization process was more intense in the 3D spheroid culture compared to the 2D monolayer model.

This brings a new discussion about the possible advantages of TiO₂ NPs on bone mineralization, which may suggest that the action of nanometric particles can contribute to the osseointegration process in titanium dental implants, reducing periprosthetic failures and using 3D cell models as an innovative technology to improve bone osteointegration induced by nanoparticles.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nano13030425/s1>, Figure S1. Primary osteoblast differentiation and mineralization: alkaline phosphatase (A) and alizarin red (B) staining in primary human osteoblasts exposed during 3, 7, and 14 days after exposure to 5 µg/mL or 100 µg/mL TiO₂ NPs. The results are representative images of three independent experiments. (scale bar: 200 µm).

Author Contributions: S.G.-P., A.R.R., W.d.S. and G.d.S.C. designed the study. G.d.S.C., W.d.S., S.G.-P., A.R.R., T.S.M.L. and J.W., performed experimental work and analyses. G.d.S.C., W.d.S., D.C.B., S.G.-P., A.R.R., J.W., J.M.G. and B.S.A. contributed technical support and discussion. G.d.S.C., W.d.S., S.G.-P., A.R.R., T.S.M.L., D.C.B. and J.M.G. wrote/edited the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) with grants 405030/2015-0, 306672/2016-2, and 467513/2014-7. J.M.G. thanks the Cientista do Nosso Estado award from FAPERJ and CNPq/Faperj—National Institute of Science and Technology in Regenerative Medicine (INCT-Regenera, process n. 465656/2014-5). A.R.R. thanks the Sinfonia project H2020 of the European Union (N.857253).

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We thank the Physical Research Centre (CBPF), the National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO), and the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), especially Maria Isabel Rossi, for all the support given to the biological experiments. The authors thank Suzana Azevedo dos Anjos for her valuable help in carrying out the sample preparation for SEM, and Mariana Moreira for her help in obtaining micrographs in SEM and TEM. The authors thank the Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ), especially Radovan Borojevic.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Awasthi, A.; Awasthi, K.K.; John, P.J. Nanomaterials in Biology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 46334–46335. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Souza, W.; Piperni, S.G.; Laviola, P.; Rossi, A.L.; Rossi, M.I.D.; Archanjo, B.S.; Leite, P.E.; Fernandes, M.H.; Rocha, L.A.; Granjeiro, J.M.; et al. The Two Faces of Titanium Dioxide Nanoparticles Bio-Camouflage in 3D Bone Spheroids. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9309. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Li, J.; Zhou, P.; Wang, L.; Hou, Y.; Zhang, X.; Zhu, S.; Guan, S. Investigation of Mg–XLi–Zn Alloys for Potential Application of Biodegradable Bone Implant Materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2021**, *32*, 43. [\[CrossRef\]](#)
- Bayda, S.; Adeel, M.; Tuccinardi, T.; Cordani, M.; Rizzolio, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* **2019**, *25*, 112. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ribeiro, A.R.; Gemini-Piperni, S.; Travassos, R.; Lemgruber, L.; Silva, C.R.; Rossi, A.L.; Farina, M.; Anselme, K.; Shokuhfar, T.; Shahbazian-Yassar, R.; et al. Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23615. [\[CrossRef\]](#)
- Delgado-Ruiz, R.; Romanos, G. Potential Causes of Titanium Particle and Ion Release in Implant Dentistry: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3585. [\[CrossRef\]](#)
- Kheder, W.; al Kawas, S.; Khalaf, K.; Samsudin, A.R. Impact of Tribocorrosion and Titanium Particles Release on Dental Implant Complications—A Narrative Review. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **2021**, *57*, 182–189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kirmanidou, Y.; Sidira, M.; Drosou, M.-E.; Bennani, V.; Bakopoulou, A.; Tsouknidas, A.; Michailidis, N.; Michalakakis, K. New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. *Biomed. Res. Int* **2016**, *2016*, 2908570. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Amengual-Peñafiel, L.; Córdova, L.A.; Constanza Jara-Sepúlveda, M.; Brañes-Aroca, M.; Marchesani-Carrasco, F.; Cartes-Velásquez, R. Osteoimmunology Drives Dental Implant Osseointegration: A New Paradigm for Implant Dentistry. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **2021**, *57*, 12–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kim, K.T.; Eo, M.Y.; Nguyen, T.T.H.; Kim, S.M. General Review of Titanium Toxicity. *Int. J. Implant. Dent.* **2019**, *5*, 10. [\[CrossRef\]](#)
- Romanos, G.; Fischer, G.; Delgado-Ruiz, R. Titanium Wear of Dental Implants from Placement, under Loading and Maintenance Protocols. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1067. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhou, Z.; Shi, Q.; Wang, J.; Chen, X.; Hao, Y.; Zhang, Y.; Wang, X. The Unfavorable Role of Titanium Particles Released from Dental Implants. *Nanotheranostics* **2021**, *5*, 321–332. [\[CrossRef\]](#)
- Christo, S.N.; Diener, K.R.; Bachhuka, A.; Vasilev, K.; Hayball, J.D. Innate Immunity and Biomaterials at the Nexus: Friends or Foes. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 342304. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Goodman, S.B.; Davidson, J.A.; Song, Y.; Martial, N.; Fornasier, V.L. Histomorphological Reaction of Bone to Different Concentrations of Phagocytosable Particles of High-Density Polyethylene and Ti-6Al-4V Alloy in Vivo. *Biomaterials* **1996**, *17*, 1943–1947. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bukata, S.V.; Gelinas, J.; Wei, X.; Rosier, R.N.; Puzas, J.E.; Zhang, X.; Schwarz, E.M.; Song, X.R.; Griswold, D.E.; O’Keefe, R.J. PGE2 and IL-6 Production by Fibroblasts in Response to Titanium Wear Debris Particles Is Mediated through a Cox-2 Dependent Pathway. *J. Orthop. Res.* **2004**, *22*, 6–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Choi, M.G.; Koh, H.S.; Kluess, D.; O’Connor, D.; Mathur, A.; Truskey, G.A.; Rubin, J.; Zhou, D.X.F.; Sung, K.-L.P. Effects of Titanium Particle Size on Osteoblast Functions in Vitro and in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4578–4583. [\[CrossRef\]](#)
- Tuan, R.S.; Lee, F.Y.-I.; Konttinen, Y.T.; Wilkinson, M.J.; Smith, R.L. What Are the Local and Systemic Biologic Reactions and Mediators to Wear Debris, and What Host Factors Determine or Modulate the Biologic Response to Wear Particles? *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2008**, *16*, S42–S48. [\[CrossRef\]](#)
- Gutwein, L.G.; Webster, T.J. Increased Viable Osteoblast Density in the Presence of Nanophase Compared to Conventional Alumina and Titania Particles. *Biomaterials* **2004**, *25*, 4175–4183. [\[CrossRef\]](#)
- Neel, A.; Bozec, L.; Perez, R.A.; Kim, H.-W.; Knowles, J.C. Nanotechnology in Dentistry: Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 6371. [\[CrossRef\]](#)
- Bédard, P.; Gauvin, S.; Ferland, K.; Caneparo, C.; Pellerin, È.; Chabaud, S.; Bolduc, S. Innovative Human Three-Dimensional Tissue-Engineered Models as an Alternative to Animal Testing. *Bioengineering* **2020**, *7*, 115. [\[CrossRef\]](#)

21. Yanagi, T.; Kajiya, H.; Fujisaki, S.; Maeshiba, M.; Yanagi-S, A.; Yamamoto-M, N.; Kakura, K.; Kido, H.; Ohno, J. Three-Dimensional Spheroids of Dedifferentiated Fat Cells Enhance Bone Regeneration. *Regen. Ther.* **2021**, *18*, 472–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Gaitán-Salvatella, I.; López-Villegas, E.O.; González-Alva, P.; Susate-Olmos, F.; Álvarez-Pérez, M.A. Case Report: Formation of 3D Osteoblast Spheroid Under Magnetic Levitation for Bone Tissue Engineering. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 672518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Schoichet, J.J.; Mourão, C.F.d.A.B.; Fonseca, E.d.M.; Ramirez, C.; Villas-Boas, R.; Prazeres, J.; Quinelato, V.; Aguiar, T.R.; Prado, M.; Cardarelli, A.; et al. Epidermal Growth Factor Is Associated with Loss of Mucosae Sealing and Peri-Implant Mucositis: A Pilot Study. *Healthcare* **2021**, *9*, 1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Romanos, G. Current Concepts in the Use of Lasers in Periodontal and Implant Dentistry. *J. Indian Soc. Periodontol.* **2015**, *19*, 490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gebhard, C.; Gabriel, C.; Walter, I. Morphological and Immunohistochemical Characterization of Canine Osteosarcoma Spheroid Cell Cultures. *Anat. Histol. Embryol.* **2016**, *45*, 219–230. [[CrossRef](#)]
26. Keller, L.; Idoux-Gillet, Y.; Wagner, Q.; Eap, S.; Brasse, D.; Schwinté, P.; Arruebo, M.; Benkirane-Jessel, N. Nanoengineered Implant as a New Platform for Regenerative Nanomedicine Using 3D Well-Organized Human Cell Spheroids. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 447–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Maia-Pinto, M.O.C.; Brochado, A.C.B.; Teixeira, B.N.; Sartoretto, S.C.; Uzeda, M.J.; Alves, A.T.N.N.; Alves, G.G.; Calasans-Maia, M.D.; Thiré, R.M.S.M. Biomimetic Mineralization on 3D Printed PLA Scaffolds: On the Response of Human Primary Osteoblasts Spheroids and In Vivo Implantation. *Polymers* **2020**, *13*, 74. [[CrossRef](#)]
28. Jensen, C.; Teng, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 33. [[CrossRef](#)]
29. Duval, K.; Grover, H.; Han, L.-H.; Mou, Y.; Pegoraro, A.F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* **2017**, *32*, 266–277. [[CrossRef](#)]
30. Białkowska, K.; Komorowski, P.; Bryszewska, M.; Miłowska, K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6225. [[CrossRef](#)]
31. Holub, A.R.; Huo, A.; Patel, K.; Thakore, V.; Chhibber, P.; Erogbogbo, F. Assessing Advantages and Drawbacks of Rapidly Generated Ultra-Large 3D Breast Cancer Spheroids: Studies with Chemotherapeutics and Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Anada, T.; Fukuda, J.; Sai, Y.; Suzuki, O. An Oxygen-Permeable Spheroid Culture System for the Prevention of Central Hypoxia and Necrosis of Spheroids. *Biomaterials* **2012**, *33*, 8430–8441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yuste, I.; Luciano, F.C.; González-Burgos, E.; Lalatsa, A.; Serrano, D.R. Mimicking Bone Microenvironment: 2D and 3D in Vitro Models of Human Osteoblasts. *Pharmacol. Res.* **2021**, *169*, 105626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sawa, N.; Fujimoto, H.; Sawa, Y.; Yamashita, J. Alternating Differentiation and Dedifferentiation between Mature Osteoblasts and Osteocytes. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13842. [[CrossRef](#)]
35. Buzea, C.; Pacheco, I.I.; Robbie, K. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases* **2007**, *2*, MR17–MR71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Corbo, C.; Molinaro, R.; Parodi, A.; Toledano Furman, N.E.; Salvatore, F.; Tasciotti, E. The Impact of Nanoparticle Protein Corona on Cytotoxicity, Immunotoxicity and Target Drug Delivery. *Nanomedicine* **2016**, *11*, 81–100. [[CrossRef](#)]
37. Arora, S.; Rajwade, J.M.; Paknikar, K.M. Nanotoxicology and in Vitro Studies: The Need of the Hour. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *258*, 151–165. [[CrossRef](#)]
38. Ribeiro, A.R.; Mukherjee, A.; Hu, X.; Shafien, S.; Ghodsi, R.; He, K.; Gemini-Piperni, S.; Wang, C.; Klie, R.F.; Shokuhfar, T.; et al. Bio-Camouflage of Anatase Nanoparticles Explored by in Situ High-Resolution Electron Microscopy. *Nanoscale* **2017**, *9*, 10684–10693. [[CrossRef](#)]
39. Gurumurthy, B.; Bierdeman, P.C.; Janorkar, A.V. Spheroid Model for Functional Osteogenic Evaluation of Human Adipose Derived Stem Cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2017**, *105*, 1230–1236. [[CrossRef](#)]
40. Yamada, Y.; Okano, T.; Orita, K.; Makino, T.; Shima, F.; Nakamura, H. 3D-Cultured Small Size Adipose-Derived Stem Cell Spheroids Promote Bone Regeneration in the Critical-Sized Bone Defect Rat Model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *603*, 57–62. [[CrossRef](#)]
41. Ho, S.S.; Murphy, K.C.; Binder, B.Y.K.; Vissers, C.B.; Leach, J.K. Increased Survival and Function of Mesenchymal Stem Cell Spheroids Entrapped in Instructive Alginate Hydrogels. *Stem Cells Transl Med.* **2016**, *5*, 773–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Cuevas-González, M.V.; Suaste-Olmos, F.; Cuevas-González, J.C.; Álvarez-Pérez, M.A. 3D Spheroid Cell Cultures and Their Role in Bone Regeneration: A Systematic Review. *Odovtos Int. J. Dent. Sci.* **2022**, *24*, 44–57. [[CrossRef](#)]
43. Lee, H.-J.; Song, Y.-M.; Baek, S.; Park, Y.-H.; Park, J.-B. Vitamin D Enhanced the Osteogenic Differentiation of Cell Spheroids Composed of Bone Marrow Stem Cells. *Medicina* **2021**, *57*, 1271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Rocha, A.L.; Bighetti-Trevisan, R.L.; Duffles, L.F.; de Arruda, J.A.A.; Taira, T.M.; Assis, B.R.D.; Macari, S.; Diniz, I.M.A.; Beloti, M.M.; Rosa, A.L.; et al. Inhibitory Effects of Dabigatran Etxilate, a Direct Thrombin Inhibitor, on Osteoclasts and Osteoblasts. *Thromb. Res.* **2020**, *186*, 45–53. [[CrossRef](#)]
45. Daly, A.C.; Davidson, M.D.; Burdick, J.A. 3D Bioprinting of High Cell-Density Heterogeneous Tissue Models through Spheroid Fusion within Self-Healing Hydrogels. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 753. [[CrossRef](#)]
46. Kim, J. bin Three-Dimensional Tissue Culture Models in Cancer Biology. *Semin Cancer Biol.* **2005**, *15*, 365–377. [[CrossRef](#)]

47. Chatzinikolaïdou, M. Cell Spheroids: The New Frontiers in in Vitro Models for Cancer Drug Validation. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 1553–1560. [[CrossRef](#)]
48. Senna, P.; Antoninha Del Bel Cury, A.; Kates, S.; Meirelles, L. Surface Damage on Dental Implants with Release of Loose Particles after Insertion into Bone. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2015**, *17*, 681–692. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.