

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ISABELA MASSARO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO BIOATIVA POR
MEIO DE ALCALINIZAÇÃO E RECOBRIMENTO COM NARINGENINA,
VISANDO O REPARO PERI-IMPLANTAR: ESTUDO *IN VITRO***

RIBEIRÃO PRETO

2022

Isabela Massaro Ribeiro

**DESENVOLVIMENTO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO BIOATIVA POR
MEIO DE ALCALINIZAÇÃO E RECOBRIMENTO COM NARINGENINA,
VISANDO O REPARO PERI-IMPLANTAR: ESTUDO *IN VITRO***

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

Orientador: Profa. Dra. Fernanda G. B. Lombardi

Ribeirão Preto

2022

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

Ribeiro, Isabela Massaro, 1992-

R484d Desenvolvimento da superfície de titânio bioativa por meio da
alcalinização e recobrimento com Narigenina, visando o reparo
peri-implantar: estudo in vitro / Isabela Massaro Ribeiro. - -
Ribeirão Preto, 2022.

50 f.: il. color.

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

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Odontologia, área de concentração: Implantodontia.
Ribeirão Preto, 2022.

1. Implantes. 2. Osteoblastos. 3. Flavonóides. 4. Titânio.
I. Título.

CDD 617.6342

ISABELA MASSARO RIBEIRO

“DESENVOLVIMENTO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO BIOATIVA POR MEIO DE ALCALINIZAÇÃO E RECOBRIMENTO COM NARINGENINA, VISANDO O REPARO PERI-IMPLANTAR: ESTUDO *IN VITRO*”

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

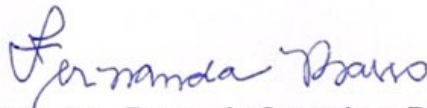
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Goncalves Basso Lombardi

Área de concentração: Implantodontia

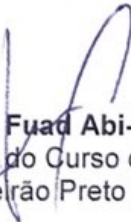
Data de defesa: 28 de abril de 2022

Resultado: Aprovada

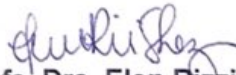
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Fernanda Goncalves Basso Lombardi
Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) – Presidente



Prof. Dr. Fuad Abi-Rached Junior
Professor Assistente Doutor do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP)



Profa. Dra. Elen Rizzi Sanchez
Professora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP)

*Dedico este trabalho para meus amados pais,
aos meus avós, minhas irmãs, ao meu noivo e
minha professora orientadora,
aos quais me apoiaram e
tornaram realidade os meus sonhos.*

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

*Agradeço, primeiramente, a **Deus** que me deu forças em todos os momentos para continuar forte e acreditando em meus sonhos e conseguir suportar todas as dificuldades encontradas ao longo do caminho.*

*Aos meus pais, **Antônio Ribeiro e Fernanda Massaro**, e meus avós **Ismael, Antônia e Maria Aparecida**, que me deram essa oportunidade, me incentivando a cada momento, tudo isso é por vocês também, minha eterna gratidão, vocês são meus maiores exemplos.*

*Minhas irmãs **Gabriela e Ligia** por sempre estarem ao meu lado e por serem minhas melhores amigas, me apoiando a cada escolha minha. Eu amo vocês.*

*Ao meu noivo, **Rodrigo**, que não deixou eu fraquejar em nenhum momento, que sempre esteve junto comigo ao longo desta caminhada, segurando em minhas mãos e não deixando eu desistir. Obrigada por ser quem você é a todo momento.*

*A minha professora, orientadora e amiga **Fernanda Basso**, por desde o começo ter acreditado em mim, pela paciência e pelas inúmeras oportunidades que me deu.*

Aos outros professores que me ensinaram muito mais do que as disciplinas impostas, muito obrigada pelas oportunidades e por terem feito parte do meu crescimento profissional e pessoal.

*A coordenadora do curso de odontologia **Profa. Dra. Yara Teresinha Correa Silva Sousa** pelo incentivo e atenção durante o curso.*

*Aos colaboradores do meu trabalho **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, a **Pós-doutoranda Taisa Nogueira Pansani** e a **Doutoranda Lais Medeiros Cardoso**, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Minha eterna Gratidão !

RESUMO

A osseointegração dos implantes orais está diretamente relacionada à sua interação com as células dos tecidos peri-implantares, que ocorre por meio de eventos como adesão à superfície do implante e à produção de matriz mineralizada, além de modulação da resposta inflamatória. Modificações da superfície dos implantes podem promover melhor interação celular, acelerando o processo de reparo dos implantes osseointegrados. Este estudo avaliou o efeito da modificação de superfície de titânio por meio da alcalinização com hidróxido de sódio (NaOH), associada ou não à naringenina, para o desenvolvimento de superfícies bioativas, visando melhorar a adesão e o metabolismo de osteoblastos humanos, o que pode acelerar o reparo peri-implantar. Inicialmente, os osteoblastos humanos foram expostos a diferentes concentrações de naringenina por 24, 48 ou 72 h, a fim de selecionar concentrações não-citotóxicas de 10, 5, 1, 0,5 µg/mL. Discos de titânio usinados foram obtidos e padronizados com lixas d'água 400,600,1200. Estes discos foram então submetidos à alcalinização com NaOH a 5 mol/L por 24 h, a 60°C. A topografia e rugosidade superficiais foram verificadas por meio de microscopia confocal. Os grupos experimentais foram divididos de acordo com os tratamentos propostos: discos alcalinizados, discos alcalinizados associados à naringenina. Os osteoblastos foram cultivados sobre os discos de titânio com diferentes superfícies (2×10^4 células/disco), previamente colocados em placas de 24 compartimentos, utilizando meio de cultura DMEM completo. Após diferentes períodos, foram avaliadas: a adesão celular, viabilidade, síntese de metaloproteinase-2 (MMP-2), atividade de fosfatase alcalina (ALP), deposição de nódulos de mineralização e expressão gênica de ALP. A topografia dos discos e a adesão celular foram avaliadas qualitativamente; os dados de rugosidade superficial, viabilidade, atividade de ALP e deposição de nódulos foram submetidos ao teste estatístico t-Student, enquanto os dados de síntese de MMP-2 e expressão de ALP foram analisados por meio do teste ANOVA a dois fatores, com pós-teste de Tukey (nível de significância de 5%). Os osteoblastos cultivados sobre a superfície alcalinizada associada à naringenina apresentaram maior adesão e espreado, bem como maior viabilidade, expressão e atividade de ALP e deposição de nódulos de mineralização. Na presença de naringenina, também foi observada modulação negativa da síntese de MMP-2. Verificou-se que a biomodificação da superfície de titânio com naringenina favorece a adesão e o metabolismo de osteoblastos, o que pode acelerar o reparo peri-implantar e consequentemente o processo de osseointegração.

Palavras-chave: Implantes. Osteoblastos. Titânio. Flavonóides

ABSTRACT

Osseointegration of oral implants is directly related to its interaction with peri-implant cells that occurs through events such as adhesion to implant's surface and synthesis of mineral matrix as also regulation of inflammatory response. Modifications of implants surface may improve cell interaction and accelerate repair process of osseointegrated implants. This investigation evaluated the effect of titanium modification by alkali treatment with NaOH, associated or not with naringenin to develop a bioactive surface aiming to improve the adhesion and metabolism of human osteoblasts, which may accelerate peri-implant repair. At first, human osteoblasts were exposed to different concentrations of naringenin for 24, 48 or 72 hours to select non-cytotoxic concentrations. Then, polished titanium discs were obtained and surface roughness was standardized by manual polishing in 400, 600 and 1200 sandpaper. These discs were submitted to alkali treatment with NaOH at 5 mol/L for 24 h at 60°C. Surface topography and roughness were evaluated by confocal microscopy. Experimental groups were divided according to treatment: alkali treated discs and alkali treated discs associated to naringenin. Osteoblasts were seeded onto distinct titanium discs (2×10^4 cells/ disc), previously allocated into 24-well plates using complete DMEM culture medium. At distinct periods cell adhesion, viability, synthesis of metalloproteinases-2 (MMP-2), alkaline phosphatase (ALP) activity, mineral nodule deposition and ALP gene expression were evaluated. Surface topography and cell adhesion were qualitatively analyzed; data of surface roughness, cell viability, ALP activity and mineral nodule deposition were subjected to t-Student statistical test, while data of MMP-2 synthesis and ALP gene expression were analyzed by ANOVA two-way and Tukey (5% significance level). Osteoblasts seeded onto alkali-treated surface associated with naringenin demonstrated higher adhesion, viability, expression and activity of ALP and mineral nodule deposition. At the presence of naringenin, down-regulation of MMP-2 was also observed. Therefore, biomodification of titanium with naringenin favors adhesion and metabolism of osteoblasts, which may accelerate peri-implant tissue.

Palavras-chave: Implants. Osteoblasts. Titanium. Flavonoids

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. PROPOSIÇÃO.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. MATERIALE MÉTODOS.....	5
3.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE OSTEOBLASTOS HUMANOS TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NARINGENINA.....	5
3.2 DESENVOLVIMENTO DE SUPERFICIE BIOATIVA POR MEIO DA ALCALINIZACAO DA SUPERFICIE DE TITÂNIO E DA IMPREGNACAO DE NARINGENINA SOBRE ESTAS SUPERFÍCIES.....	7
3.2.1 Obtenção dos Discos de Titânio.....	7
3.2.2 Alcalinização das Superfícies de Titânio.....	8
3.2.3 Análise da Rugosidade Superficial.....	9
3.2.4 Impregnação da Naringenina.....	9
3.2.5 Análise da Liberação de Naringenina em Solução Aquosa.....	10
3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ALCALINIZACAO ASSOCIADA À IMPREGNAÇÃO A NARINGENINA NA ADESÃO E METABOLISMO DE OSTEOBLASTOS HUMANOS.....	10
3.3.1 Cultura de Osteoblastos Humanos.....	10
3.3.2 Avaliação da Adesão Celular.....	11
3.3.3 Avaliação da Proliferação Celular.....	12
3.3.4 Síntese de Metaloproteinases.....	12
3.3.5 Análise da Atividade de Fosfatase Alcalina.....	13
3.3.6 Deposição de Nódulos de Mineralização.....	13
3.3.7 Expressão Genica de Marcador de Diferenciação Osteoblástica.....	14
3.4 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	16
4 RESULTADOS.....	17
4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE OSTEOBLASTOS HUMANOS TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NARINGENINA.....	17
4.2 ANÁLISE DA ROPOGRAFIA E RUGOSIDADE SUPERFICIAIS.....	19
4.3 AVALIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA DE SOLUÇÕES DE NARINGENINA EM LEITOR UV-VIS.....	20
4.4 ADESÃO CELULAR.....	20
4.5 VIABILIDADE CELULAR.....	22
4.6 SINTESE DE MMP-2.....	23
4.7 ATIVIDADE DE ALP E DEPOSIÇÃO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO.....	24
4.8 EXPRESSAO GÊNICA DE ALP.....	25
5 DISCUSSÃO.....	26
6 CONCLUSÕES.....	29
7 REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

O processo de osteointegração está relacionado a uma íntima inter-relação entre o implante e o tecido ósseo alveolar. Após a instalação do implante, ocorre a formação do coágulo e de um tecido de granulação, responsáveis por manter o espaço funcional peri-implantar e, futuramente, ocorre a migração de osteoblastos e células indiferenciadas para a região peri-implantar. Estas células se depositam sobre a superfície de titânio e iniciam a síntese de uma matriz colágena, que será remodelada e mineralizada, para a obtenção de um tecido ósseo maduro (ZENG *et al.*, 2019).

Alguns fatores locais e sistêmicos podem interferir na formação do tecido ósseo (ROMANOS *et al.*, 2019). Como fatores locais inerentes ao paciente, podemos citar a quantidade de osso disponível para receber o implante, vascularização local, sendo que este fator está relacionado a capacidade de reparo do tecido ósseo receptor, a condição odontológica avaliada na oroscopia do paciente, com principal relação à saúde periodontal, devido a estrita relação entre o implante e os tecidos de sustentação orais (KULLAR & MILLER, 2019). Considerando os fatores sistêmicos, estes incluem a capacidade de resposta imune inata do indivíduo, doenças sistêmicas como diabetes, cardiopatias, as discrasias sanguíneas, hepatopatias, alterações metabólicas como a osteoporose (KULLAR & MILLER, 2019), além do uso de medicamentos, como os bisfosfonatos (ROMANOS, 2019).

Ainda sobre os fatores locais, a manutenção prolongada de uma resposta inflamatória local, caracterizada pelo aumento da concentração local de mediadores pró-inflamatórios, pode atrasar a progressão do processo de reparo para a fase migratória e proliferativa, atrasando o processo de osseointegração (ROMANOS *et al.*, 2019). A manutenção ou cronificação da resposta inflamatória está relacionada não só com a presença de altas concentrações e citocinas pró-inflamatórias, mas também de metaloproteinases da matriz (MMPs). Estas enzimas proteolíticas atuam fisiologicamente na remodelação tecidual, porém, em altas concentrações, podem levar a uma desorganização da matriz colágena, impedindo a formação de um tecido ósseo maduro (GOMES *et al.*, 2019).

Quando ocorre uma disbiose, isto é um desequilíbrio da microbiota local, associado à presença e patogenicidade de agentes infecciosos, como bactérias envolvidas na peri-implantite, observa-se um aumento da concentração local de mediadores pró-inflamatórios, como MMPs e a extensão da fase inflamatória (GOMES *et al.*, 2019).

Sendo assim, a regulação local da síntese e atividade de metaloproteinases pode interferir positivamente na aceleração do processo de reparo peri-implantar.

Outros fatores importantes estão relacionados ao implante, como material utilizado, tipo de implante e presença e tipo de tratamento de superfície.

A modificação de superfícies tem demonstrado efeitos significativos na melhora da adesão dos osteoblastos as superfícies de titânio e no processo de osseointegração (WENNERNBERG *et al.*, 2009). Estas modificações visam principalmente aumentar a superfície de contato dos implantes com o tecido ósseo adjacente, por meio do aumento da rugosidade superficial (TRENTO *et al.*, 2020). Tais modificações podem ser realizadas por meio de jateamento de partículas, polimento mecânico (ALLA *et al.*, 2011), eletropolimento, oxidação anódica, tratamentos ácidos (LARSSON *et al.*, 1996) ou ainda por tratamentos alcalinos (KOKUBO *et al.*, 2004) e lasers de alta potência, (MARISCAL-MUÑOZ *et al.*, 2015).

Uma destas modificações é baseada na alcalinização superficial, que visa a criação de uma superfície hidrofílica e de maior rugosidade, que melhora a adesão e o metabolismo dos osteoblastos (NISHIGUCHI *et al.*, 2003; TUGULU *et al.*, 2010; CARMARGO *et al.*, 2017). Este tratamento alcalino também parece atuar de forma a facilitar adesão de moléculas orgânicas, o que pode biomodificar estas superfícies, transformando-as em bioativas, e desta forma, modular a resposta das células do tecido ósseo, bem como aos tecidos circunjacentes (CAI *et al.*, 2006; ENGLE *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2019)

Assim, o tratamento da superfície de titânio por alcalinização tem se tornado um método para carrear biomoléculas e favorecer o reparo peri-implantar (GAGGERI *et al.*, 2013). Uma das biomoléculas que pode ser utilizada para tal fim são bioflavonóides (GAGGERI *et al.*, 2013).

Esses são compostos bioativos, ou seja, compostos que agem diretamente em uma célula, tecido e organismo vivo, com função antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e podem prevenir doenças, como doenças cardiovasculares. São exemplos de alguns flavonoides a naringenina, a hesperetina, quercetina, o kaempferol, a miricetina, luteolina, apigenina e tangeretina, dentre outras (YAO *et al.*, 2021).

Dentre estas moléculas, a naringenina, um flavonóide de origem cítrica, que pode ser obtida sinteticamente, parece ser uma molécula promissora na regulação do reparo tecidual, já que tem apresentado bons resultados na regulação da resposta inflamatória e

oxidativa das células a mucosa oral e outras células (GAGGERI *et al.*, 2013) além de ser também capaz de modular negativamente a síntese e atividade de metaloproteinases da matriz por estas células (dados não publicados). Porém, ainda não há dados na literatura que avaliem os efeitos da naringenina como mediador da resposta de osteoblastos no reparo peri-implantar. A utilização deste composto sobre a superfície do implante poderia acelerar o reparo ósseo peri-implantar.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve com objetivo determinar o efeito da alcalinização da superfície de discos de titânio e da impregnação da naringenina na adesão, proliferação e metabolismo de osteoblastos humanos, visando estimular funções celulares relacionadas ao reparo peri-implantar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as concentrações de naringenina que não apresentassem efeito citotóxico sobre osteoblastos humanos.

Desenvolver e caracterizar a superfície bioativa por meio da alcalinização da superfície de titânio e da impregnação de naringenina sobre estas superfícies, por meio da análise da topografia e rugosidade superficial.

Avaliar o efeito da alcalinização associada a impregnação da naringenina na adesão, proliferação de osteoblastos humanos, bem como a síntese de MMP-2, atividade de fosfatase alcalina (ALP), deposição de nódulos de mineralização e expressão gênica de ALP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

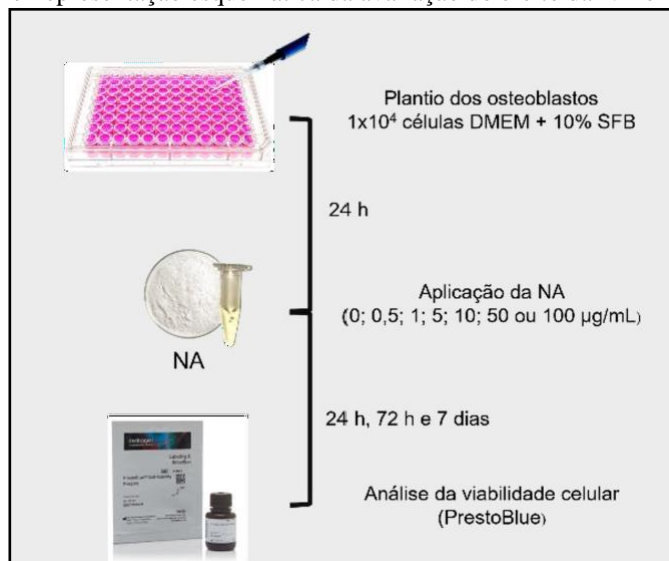
3.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NARINGENINA

Foram utilizados osteoblastos humanos da linhagem SaOs-2 (ATCC# HTB85). Estas células foram mantidas em frascos de cultura celular de 75cm² em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium- DMEM (Gibco, Cralsbad, CA, EUA) contendo 1% de solução antibiótica (Gibco) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) até que seja obtida confluência de 80%. Os subcultivos foram realizados utilizando tripsina/EDTA (Gibco).

Para esse estudo foi utilizada a naringenina, obtida sinteticamente (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Este composto foi inicialmente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração estoque de 1mg/mL. As concentrações avaliadas foram diluídas diretamente em meio de cultura.

A partir da obtenção do número de células necessário para o experimento, as células foram cultivadas em placas de 96 compartimentos (1x10⁴ células/compartimento) em meio de cultura completo e incubadas por 24 h em incubadora de CO₂ (5%) a 37 °C. Após este período, foram tratadas com as soluções aquosas de naringenina (NA) nas concentrações de 100, 50, 10, 5, 1, 0,5 µg/ml em meio livre de SFB. O grupo controle positivo foi mantido em meio livre de SFB, enquanto o grupo controle negativo foi tratado com peróxido de hidrogênio 3%. Após 24 h, 72 h e 7 dias foi determinada a viabilidade dos osteoblastos, utilizando o ensaio PrestoBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática da avaliação do efeito da NA em diferentes concentrações sobre os



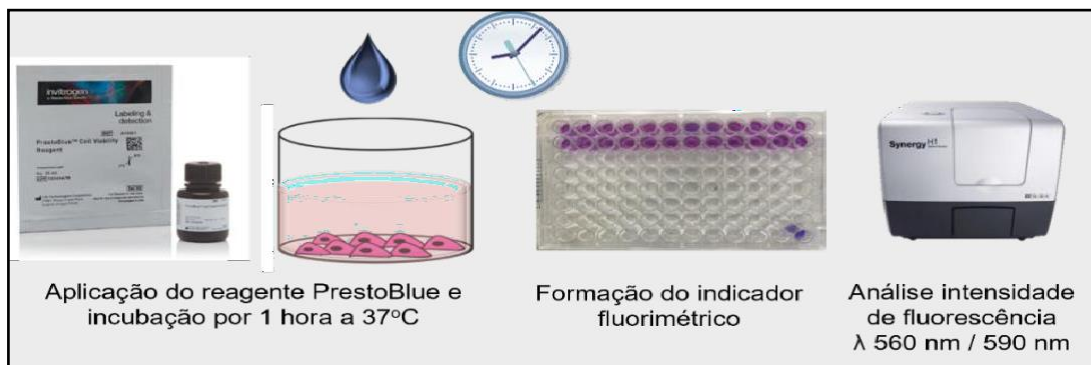
osteoblastos.

Fonte: autor

Esse ensaio foi baseado na oxirredução da resazurina, resultando em um marcador fluorescente, sendo esta fluorescência diretamente proporcional ao número de células viáveis. Desta forma, a solução PrestoBlue foi adicionada às células na concentração de 10% em meio DMEM (Gibco, Cralsbad, CA, EUA) livre de SFB. Após 1 h de incubação a 37°C, foi determinada a intensidade de fluorescência (560 nm/590 nm) (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT, USA) A média dos resultados obtidos para o grupo controle positivo foi considerada como 100% de viabilidade e todos os grupos foram avaliados em comparação a este (Figura 2).

Após essa avaliação, foi selecionada a maior concentração aplicada que não apresentasse efeito citotóxico sobre os osteoblastos humanos, de acordo com os padrões da ISO (ISSO 10993-522).

Figura 2. Representação esquemática do teste de PrestoBlue.

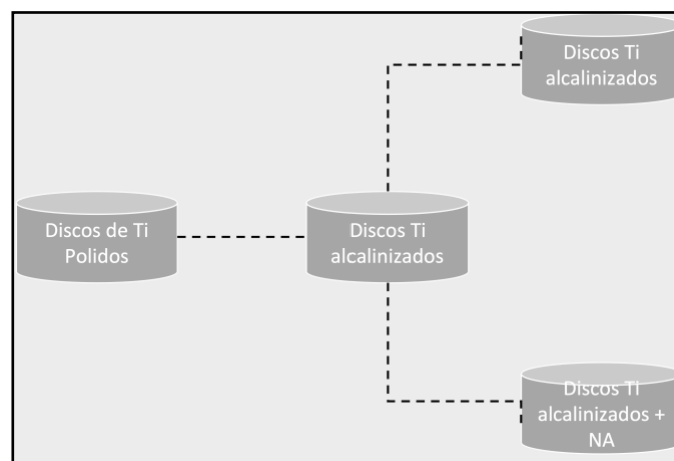


Fonte: autor

3.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE BIOATIVA POR MEIO DA ALCALINIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO E DA IMPREGNAÇÃO DE NARINGENINA SOBRE ESTAS SUPERFÍCIES

Após seleção da concentração de NA, os discos de titânio foram preparados, sendo obtidos os grupos experimentais apresentados na Figura 3.

Figura 3. Definição dos grupos experimentais.



Fonte: autor

3.2.1 Obtenção dos Discos de Titânio

Foram obtidos discos de Ti usinados com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Todos os discos de Ti foram lixados com lixas d'água de granulação 400, 600 e 1.200, para obtenção de rugosidade superficial padronizada (Figura 4). Anteriormente ao cultivo celular, os discos foram avaliados quanto à rugosidade superficial em microscópio

confocal.

Para remover qualquer material orgânico aderido à superfície, os discos foram submetidos à limpeza em ultrassom, de acordo com o seguinte protocolo (PANSANI et al., 2019):

- 1) Imersão por 30 min em acetona;
- 2) Imersão por 30 min em água destilada;
- 3) Imersão por 30 min em etanol 100%;
- 4) Imersão por 30 min em água destilada;

Figura 4. Protocolo de padronização dos discos de titânio



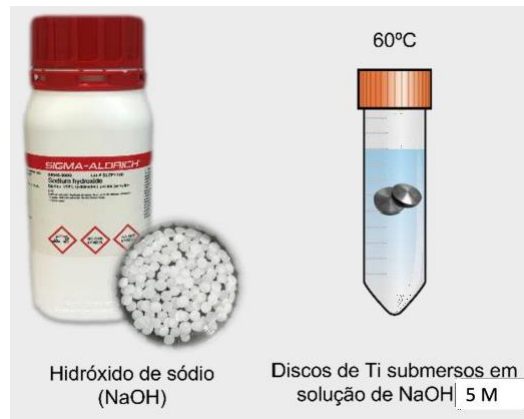
Fonte: autor

3.2.2 Alcalinização das Superfícies de Titânio

Para a obtenção de superfícies de maior rugosidade e maior afinidade a biomoléculas, foi utilizado o protocolo de alcalinização. Este consistiu na imersão dos discos de Ti em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 5 mol/L (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a 60°C por 24 h, sob agitação (CAMARGO *et al.*, 2017) (Figura 5).

Os discos foram esterilizados em autoclave previamente ao protocolo de alcalinização e após o protocolo, foram lavados em água deionizada esterilizada por 1 h, sob agitação.

Figura 5. Protocolo de alcalinização da superfície dos discos de titânio

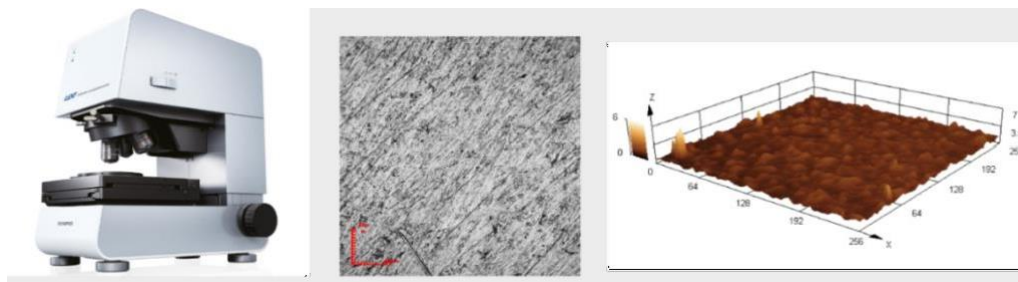


Fonte: autor

3.2.3 Análise da Rugosidade Superficial

Os discos foram então avaliados quanto a sua rugosidade superficial em microscópio confocal de materiais (n=6). Foi avaliada a rugosidade de 5 áreas lineares distintas de cada disco e a rugosidade de cada disco foi determinada pela média das 5 áreas (Figura 6).

Figura 6. Análise da topografia e rugosidade superficial dos discos de titânio



Fonte: autor

3.2.4 Biomodificação da Superfície por Impregnação da Naringenina

Para este protocolo, os discos alcalinizados foram recobertos com 20 μ l da solução aquosas de naringenina, na concentração de 10 μ g/mL. Os discos foram submersos nas soluções por 2 h, sob agitação, a temperatura ambiente.

3.2.5 Análise da Liberação de Naringenina em Solução Aquosa

A efetividade da impregnação da naringenina e também o potencial de liberação foram avaliados por meio de avaliação em fotoespectrometria UVVIS 280 nm (n=8). Para tanto, após a impregnação, os discos foram colocados em dessecador por 24 h. A seguir, foram submersos em solução de tampão fosfato (PBS 1X) a 37°C. Inicialmente, a liberação de naringenina foi avaliada a cada 15 minutos, por 2 horas. Para esta avaliação, foram recolhidos 100 µL da solução de PBS (phosphate buffer solution), que foram avaliados por espectrofotômetro UVVis a 295nm.

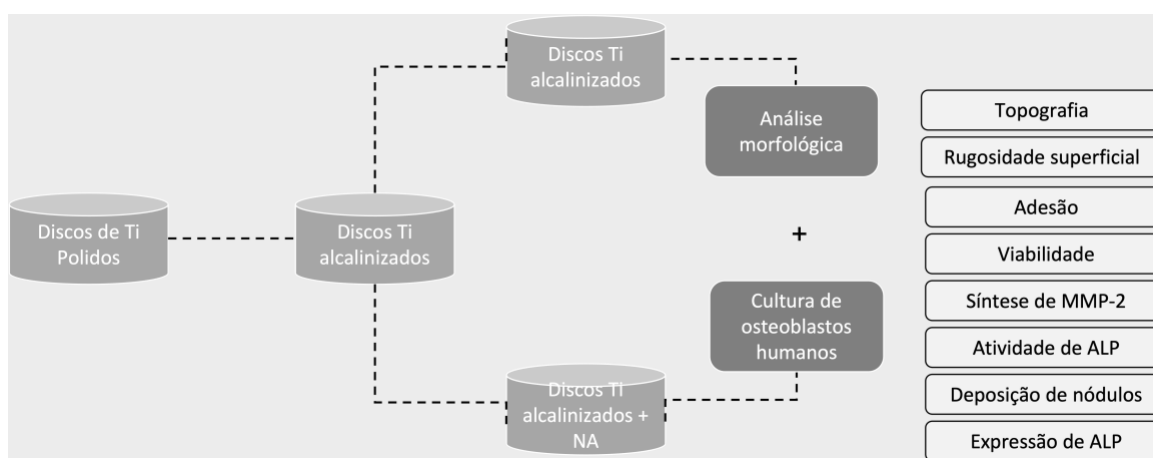
3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ALCALINIZAÇÃO ASSOCIADA A IMPREGNAÇÃO DA NARINGENINA NA ADESÃO E METABOLISMO DE OSTEOBLASTOS HUMANOS

3.3.1 Cultura de Osteoblastos Humanos

Para determinar o efeito da impregnação da naringenina sobre os discos de titânio alcalinizados, foi utilizada a linhagem osteoblástica SaOs-2, que foi mantida conforme descrito no item anterior.

Foram estabelecidos os grupos experimentais e análises apresentados na Figura 7.

Figura 7. Distribuição dos grupos experimentais e análises propostas



Fonte: autor

Para essa etapa do projeto, os discos usinados ou previamente alcalinizados, impregnados ou não com naringenina, foram colocados em placas de 24 poços e as células foram cultivadas sobre esses discos na densidade de 2×10^4 células/disco em meio de cultura DMEM completo, por 24 h, 48 h ou 7 dias (Figura 8). Após esses períodos, foram realizadas as avaliações propostas.

Figura 8 Cultura de osteoblastos sobre os discos de titânio



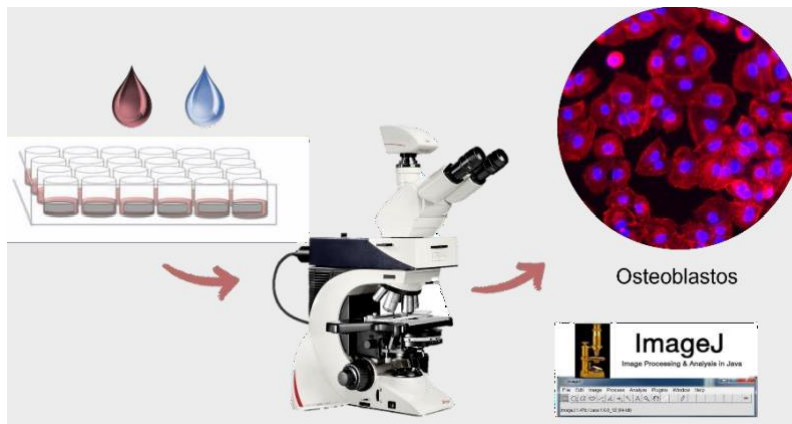
Fonte: Cardoso, 2020.

3.3.2 Avaliação da Adesão Celular

A adesão dos osteoblastos às superfícies de titânio foi determinada por fluorescência direta, utilizando um marcador de citoesqueleto (Actin Red, Invitrogen 650 nm) e um intercalante de DNA (Hoescht, Invitrogen) ($n=6$). Em cada período proposto, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 min, seguido de lavagem em PBS 1x, permeabilização com Triton x-100 (0,1% - Sigma-Aldrich) e incubação com Actin Red por 30 min. A seguir, as células foram novamente lavadas em tampão fosfato e submetidas a marcação nuclear com Hoescht (1:5000) por 15 min.

As amostras foram qualitativamente analisadas por microscopia de fluorescência. Cinco campos de cada amostra foram fotografados e analisados quantitativamente em *software* ImageJ (Figura 9).

Figura 9. Representação esquemática da análise da adesão dos osteoblastos sobre as superfícies de titânio por meio de fluorescência direta com marcação de citoesqueleto e núcleo.



Fonte: autor

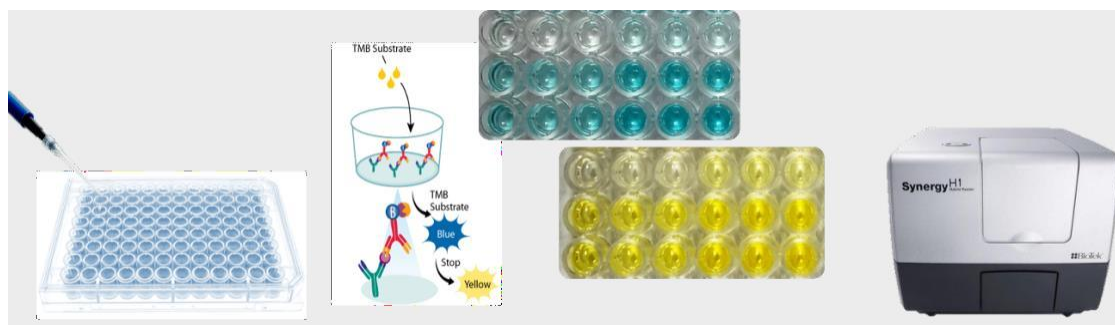
3.3.3 Avaliação da Proliferação Celular

A proliferação dos osteoblastos foi determinada pelo ensaio PrestoBlue (n=8), conforme protocolo apresentado no item 3.1 .

3.3.4 Síntese de Metaloproteinasas

O efeito da naringenina sobre a síntese de metaloproteínase 2 (MMP- 2) por osteoblastos foi determinado por meio do imunoensaio ELISA, seguindo recomendações do fabricante. O período de análise foi determinado a partir de um estudo piloto, utilizando o fator de necrose tumoral alfa como controle positivo (Figura 10).

Figura 10. Representação esquemática da análise da síntese de MMP pelo imunoensaio ELISA



Fonte: autor

3.3.5 Análise da Síntese de Fosfatase Alcalina

A capacidade de mineralização celular foi determinada por meio da análise da atividade da enzima fosfatase alcalina, que participa da mineralização da matriz colágena e é encontrada na membrana celular. Este teste foi realizado utilizando um ensaio de ponto final, baseado na clivagem de timolftaleína. (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) (Figura 11). Para este teste, foi necessário realizar a lise celular com um solvente de Lauril Sulfato de Sódio a 1%, por 40 minutos. Para cada amostra, foram preparados tubos contendo tampão e substrato (timolftaleína), que foram pré-aquecidos a 37°C por 2 minutos. A seguir, foram adicionados 50 µL de cada amostra. Após 10 min de incubação a 37°C, foi adicionado o reagente colorimétrico, seguido de plaqueamento e análise por meio de meio de absorvância. A concentração de ALP para cada amostra foi determinada a partir de curva-padrão.

Figura 11. Representação esquemática da análise da atividade de ALP



Fonte: autor

3.3.6 Deposição de Nódulos de Mineralização

Para avaliar a deposição de nódulos de mineralização sobre os discos de titânio, após os tratamentos propostos, as células foram fixadas em etanol 70%, por 1 h. A formação dos nódulos de mineralização foi observada por meio do Teste de Alizarin Red, como descrito a seguir:

Após a fixação, as células foram lavadas com água deionizada por 5 min. A seguir, foi adicionada a solução de Alizarin Red (40 mmol/L; pH 4,2) (Sigma- Aldrich), por 20 min, sob agitação. As amostras foram, então, lavadas com água deionizada por 5 min. Com o objetivo de analisar quantitativamente a formação dos nódulos, as amostras foram solubilizadas em 1 mL de cloreto de cetilpiridíneo a 10% (Sigma-Aldrich), por 15 min, sob agitação.

Após verificação da homogeneidade das soluções, três alíquotas de 100 μ L de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp.), seguido de análise espectrofotômetro a 562 nm (Synergy H1) (Figura 12).

Figura 12. Representação esquemática da análise da deposição de nódulos de mineralização sobre as amostras



Fonte: autor

3.3.7 Expressão Gênica de Marcador de Diferenciação Osteoblástica

A expressão do marcador de diferenciação, fosfatase alcalina (ALP) foi determinada por meio do PCR em tempo real, após 7 dias do cultivo dos osteoblastos sobre as superfícies funcionalizadas.

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

As reações foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real Syber Green Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), adicionando os conjuntos de primers específicos para cada gene (Tabela 1). As leituras de fluorescência foram realizadas a cada ciclo de amplificação, utilizando-se para isto o equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) e, posteriormente, analisadas pelo Step One Software 2.1 (Applied Biosystems). Todas as reações foram normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de

volume e evaporação ao longo da reação, e o resultado, expresso em valor de CT (referente ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção) foram normalizados de acordo com a expressão do gene endógeno selecionado (RPL13).

Tabela 1. Sequencia dos primers utilizados para cada gene alvo

Gene alvo	Sequencia de primers
hRPL13	<i>Forward – 5' CCGCTCTGGACCGTCTCAA 3'</i> <i>Reverse – 5' CCTGGTACTTCCAGCCAACCT 3'</i>
hALP	<i>Forward – 5'GACAAGAAGCCCTTCACTGC 3'</i> <i>Reverse – 5' AGACTGCGCCTGGTAGTTGT3'</i>

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

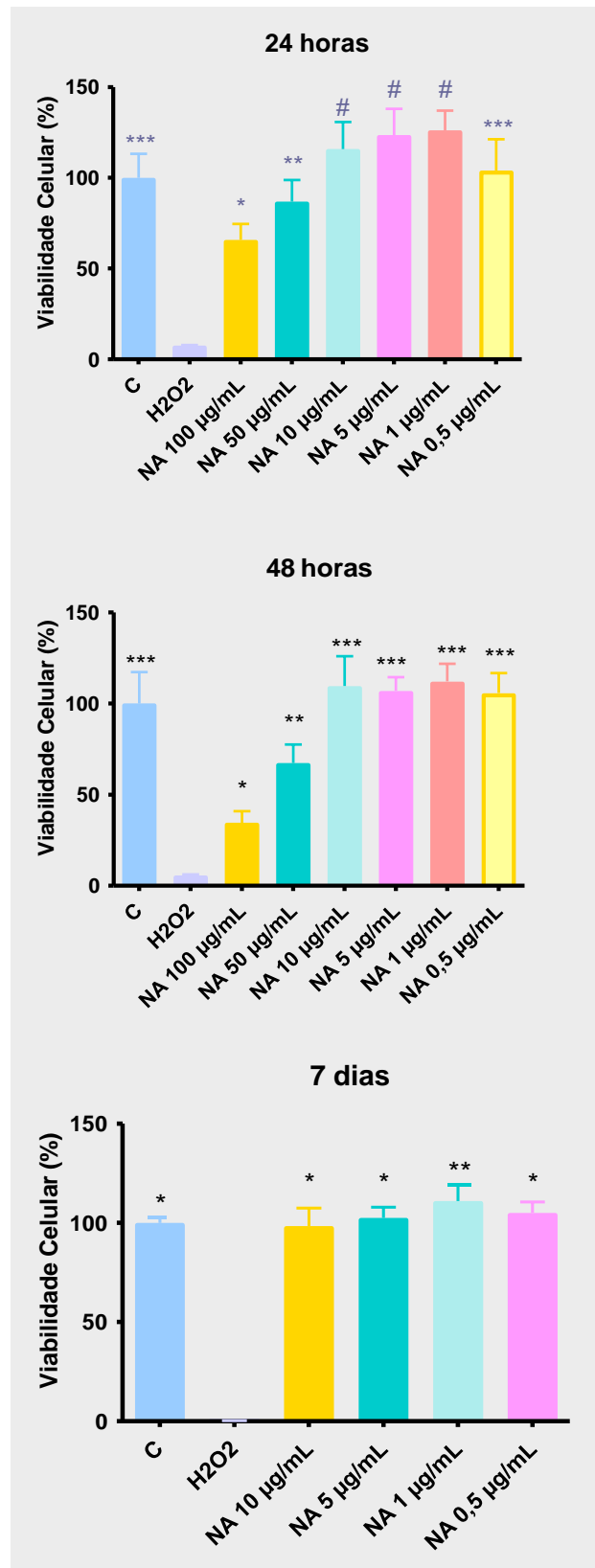
O conjunto dos demais dados foi avaliado quanto à sua distribuição. Havendo aderência à curva normal e homocedasticidade por meio de Levene, foram selecionados testes paramétricos. Os dados de rugosidade superficial, viabilidade, atividade de ALP e deposição de nódulos de mineralização foram analisados por meio do teste t- Student, enquanto os dados de síntese de MMP-2 e expressão genica de ALP foram analisados por meio do teste ANOVA a dois critérios e pós-teste de Tukey. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância pré- determinado de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NARINGENINA

A análise do efeito das diferentes concentrações de NA sobre os osteoblastos em cultura demonstrou que, para os períodos de 24 e 48 h, as concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ reduziram significativamente a viabilidade destas células, enquanto concentrações de 10, 5, 1 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ foram citocompatíveis. Desta forma, apenas estas concentrações foram aplicadas para avaliar a viabilidade dos osteoblastos expostos às diferentes soluções de NA pelo período de 7 dias. Nessa análise, por sua vez, foi demonstrado que a aplicação de NA em todas as concentrações avaliadas resultou em viabilidade semelhante ou maior que a do grupo controle (Figura 13).

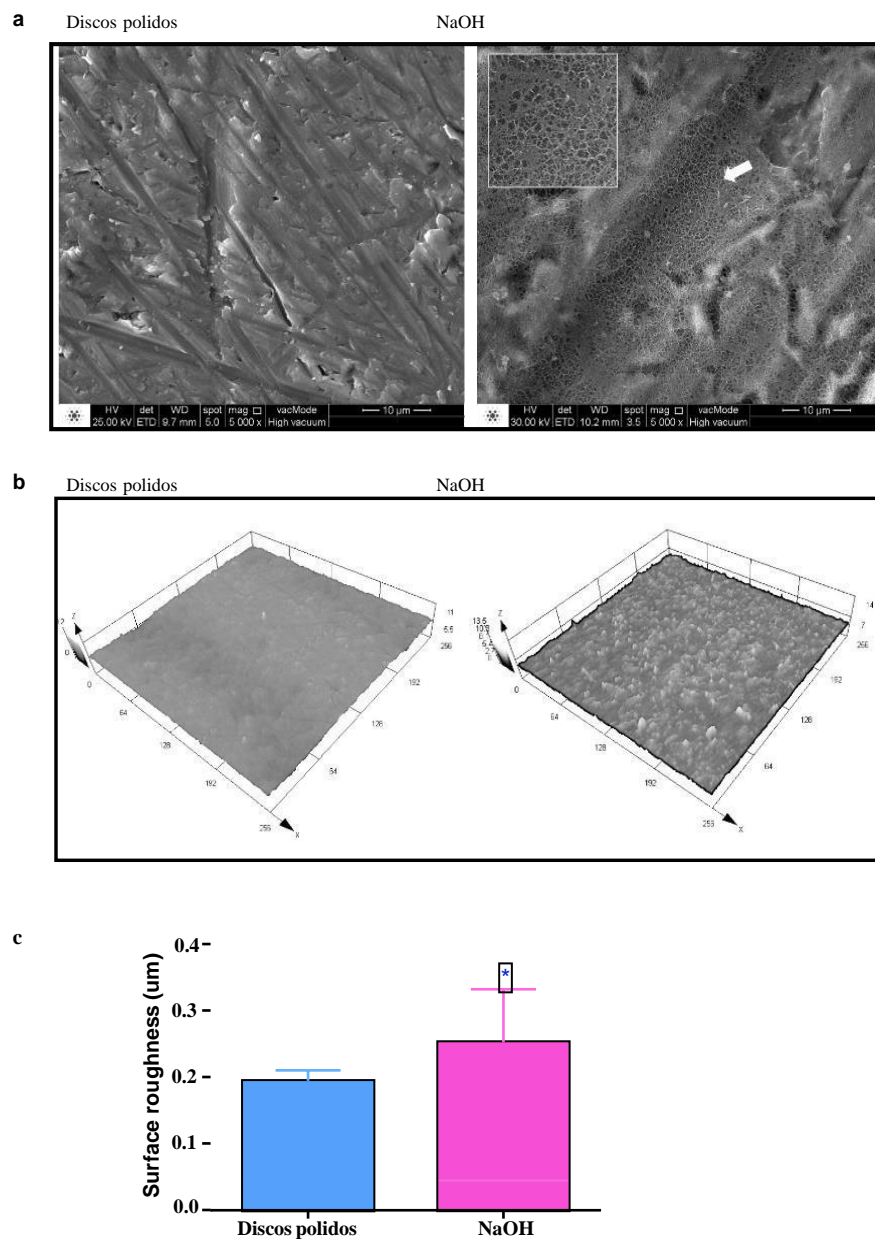
Figura 13. Viabilidade dos osteoblastos tratados com diferentes concentrações de NA, pelos períodos de (a) 24 h, (b) 48 h e (c) 7 dias (PrestoBlue; n=6). Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (n=6; ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).



4.2 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE SUPERFICIAIS

A superfície submetida ao protocolo de alcalinização apresentou topografia mais irregular quando comparada à superfície polida. De forma semelhante, a rugosidade da primeira também foi significativamente maior (Figura 14).

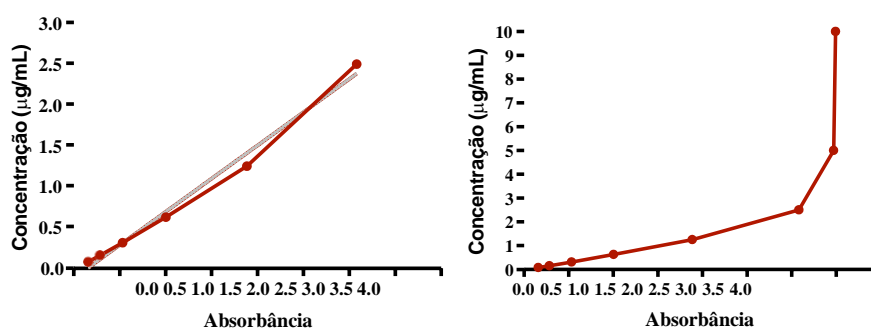
Figura 14. Topografia (a, b) e rugosidade superficiais (c) dos discos de Ti polidos e alcalinizados. Para a análise da rugosidade, barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (n=6; t-Student, $p < 0,05$).



4.3 AVALIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA DE SOLUÇÕES DE NARINGENINA EM LEITOR UV-VIS

Após leitura em 280 nm foi possível observar uma saturação do equipamento, a partir da concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, após eliminação dos pontos de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, foi possível determinar uma curva padrão, que permitiu a avaliação da liberação da NA a partir das superfícies de titânio submetidas a impregnação com este bioflavonóide (Figura 15).

Figura 15. Absorbância das soluções aquosas de NA em espectrofotômetro UV-Vis (280nm) (n=8).

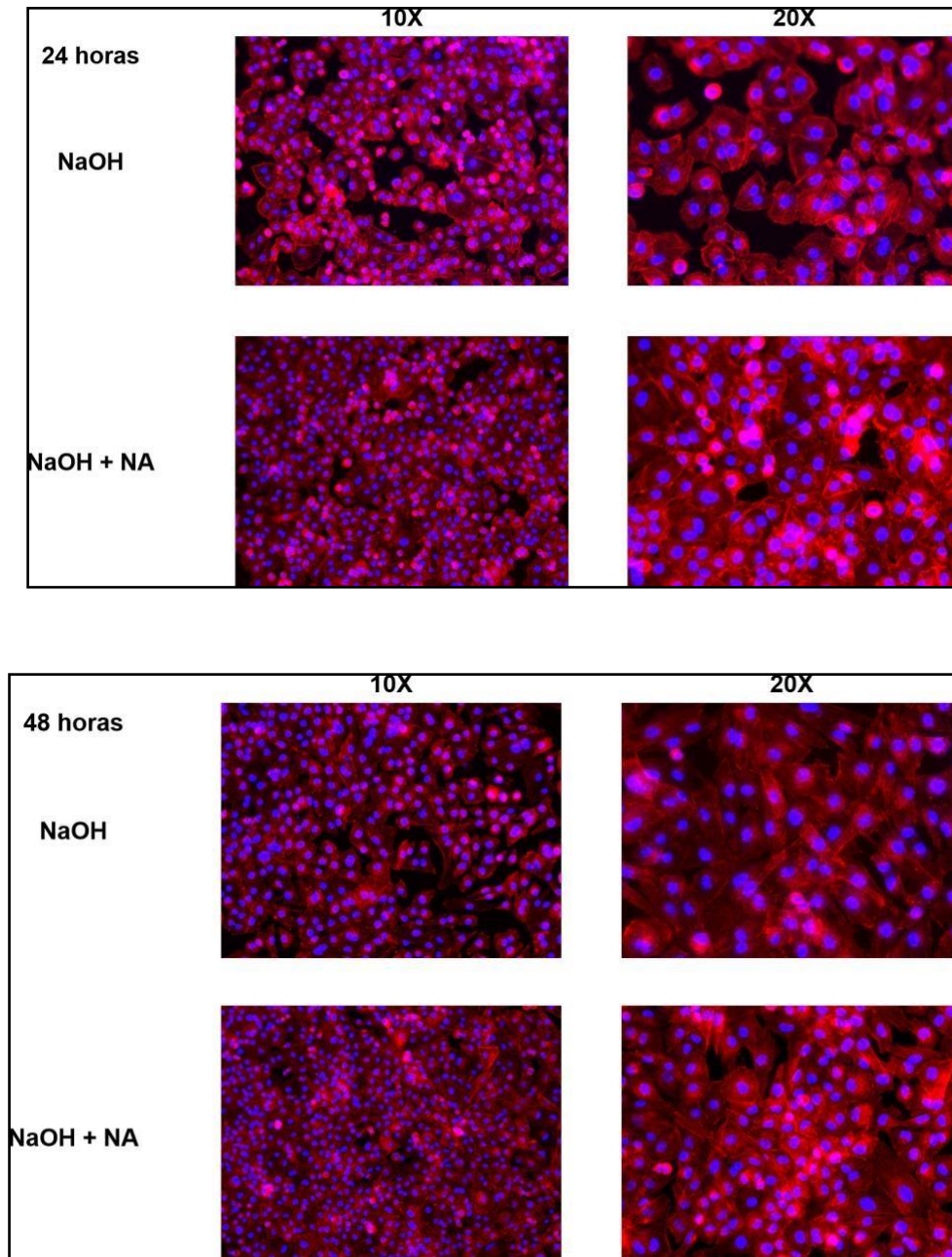


Fonte: autor

4.4 ADESÃO CELULAR

A análise qualitativa da adesão dos osteoblastos às superfícies avaliadas demonstrou maior número de células sobre a superfície submetida a absorção com NA. Além disso, para ambos os períodos avaliados, nota-se maior espreadimento das células sobre essa superfície quando comparada à superfície alcalinizada (Figura 16).

Figura 16. Fotomicrografias dos osteoblastos aderidos às superfícies de Ti alcalinizadas e impregnadas ou não com NA, após 24 e 48 h de cultivo. Em vermelho, observa-se os filamentos de actina do citoesqueleto e em azul, o núcleo celular. (n=2)

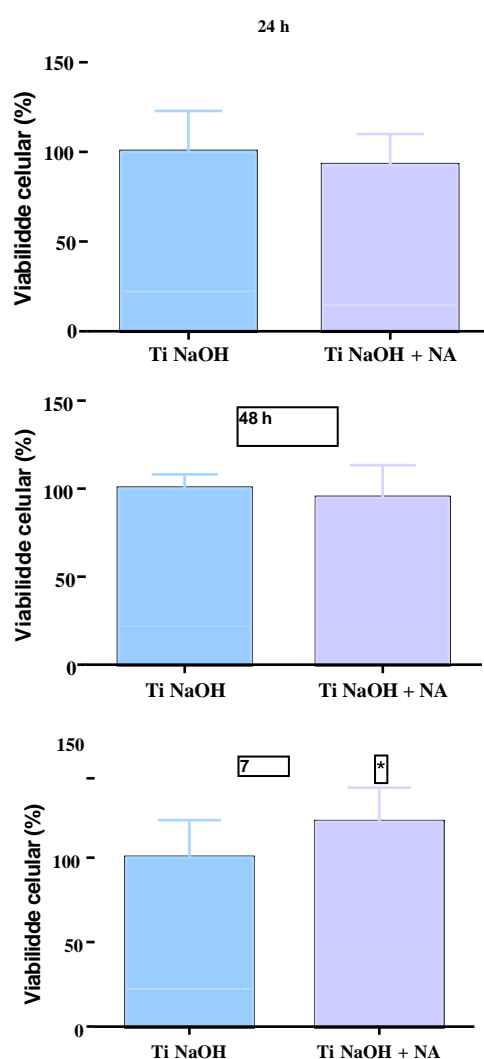


Fonte: autor

4.5 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade dos osteoblastos foi semelhante para as células cultivadas sobre os discos somente alcalinizados e impregnados com NA para os períodos de 24 e 48 h. Porém, após 7 dias do cultivo celular, a viabilidade dos osteoblastos cultivados sobre os discos impregnados com NA foi significativamente maior (Figura 17).

Figura 17. Viabilidade dos osteoblastos cultivados sobre os discos de Ti alcalinizados e impregnados ou não com NA, pelos períodos de 24 h, 48 h e 7 dias (PrestoBlue; n=6). Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (n=6; t-Student, $p < 0,05$).

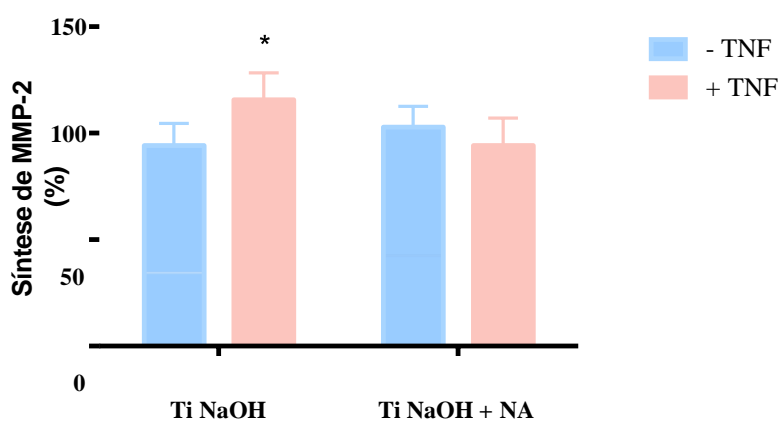


Fonte: autor

4.6 SÍNTESE DE MMP-2

A síntese de MMP-2 foi exacerbada na presença do fator necrose tumoral alfa, modulando a síntese desta enzima. Foi utilizado como controle positivo do teste (Figura 18). Para os demais grupos, não houve alteração significativa na síntese dessa enzima.

Figura 18. Síntese de MMP-2 por osteoblastos cultivados sobre os discos de Ti alcalinizados e absorvidos ou não com NA, após 24 h (ELISA; n=6). Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (n=6; ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).

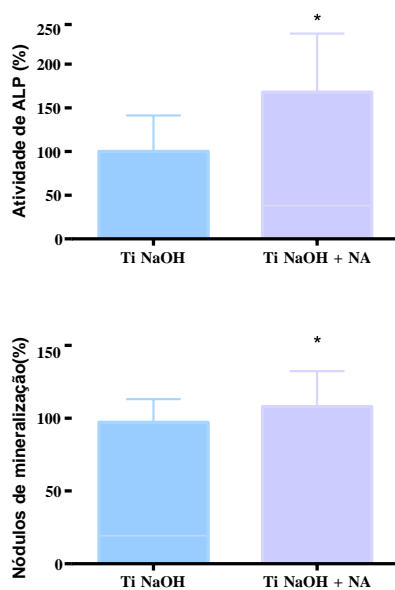


Fonte: autor

4.7 ATIVIDADE DE ALP E DEPOSIÇÃO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO

A análise do efeito da impregnação dos discos de Ti com NA sobre o metabolismo dos osteoblastos demonstrou que, após 7 dias de contato na presença do bioflavonóide, estas células apresentaram aumento significativo da atividade de ALP e da deposição de nódulos mineralizados (Figura 19).

Figura 19. Atividade de ALP e deposição de nódulos mineralizados por osteoblastos cultivados sobre os discos de Ti alcalinizados e impregnados ou não com NA, por 7 dias (n=6). Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (n=6; t- Student, $p < 0,05$).

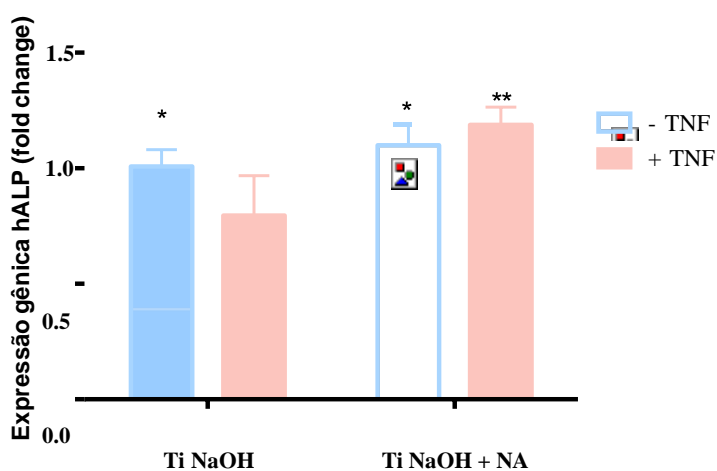


Fonte: autor

4.8 EXPRESSÃO GÊNICA DA FOSFATASE ALCALINA

As células cultivadas sobre os discos alcalinizados e tratados com NA apresentaram expressão semelhante ao grupo somente alcalinizado. No entanto, na presença do estímulo inflamatório, esta expressão foi significativamente maior para o grupo de discos submetidos ao tratamento com NA ($p < 0,05$) (Figura 20).

Figura 20. Expressão gênica de hALP por osteoblastos cultivados sobre os discos de Ti alcalinizados e impregnados ou não com NA, por 7 dias ($n=6$). Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($n=6$; ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: autor

5. DISCUSSÃO

O sucesso da instalação de implantes osseointegráveis depende de um selamento mucoso e ósseo eficazes, obtidos a partir da relação direta entre os tecidos peri-implantares e a superfície do implante (BRÅNEMARK *et al.*, 1977).

Alguns fatores podem interferir negativamente na formação desse tecido, como altas concentrações de fatores pró-inflamatórios, como citocinas (ROMANOS *et al.*, 2019) e metaloproteinases da matriz (GOMES *et al.*, 2019) que podem estar relacionadas à manutenção da fase inflamatória e atraso da fase proliferativa do processo de reparo do tecido ósseo, levando a maior tempo de osseointegração.

Para a execução deste projeto *in vitro*, uma linhagem osteoblástica humana foi selecionada, sendo estas células cultivadas em modelo de cultura que tem por objetivo simular o contato das células com o implante, visando mimetizar o reparo peri-implantar, visto que estudos anteriores demonstraram que o fenótipo celular está diretamente relacionado com o substrato (ROSS *et al.*, 2012). Este modelo experimental já foi aplicado e validado na literatura (PANSANI *et al.* 2021).

Bioflavonóides, como a naringenina, têm apresentado efeito significativo na modulação da resposta inflamatória e oxidativa de diferentes tipos celulares (GAGGERI *et al.*, 2013) além de serem capazes de modular a síntese de metaloproteinases. Sendo assim, a aplicação destes compostos pode ser uma alternativa promissora para acelerar o reparo peri-implantar.

Para otimizar a impregnação da naringenina sobre as superfícies de titânio e assim determinar o efeito deste bioflavonóide no metabolismo de osteoblastos, os discos foram submetidos à alcalinização com NaOH (YAMAGUCHI *et al.*, 2017; PANSANI *et al.*, 2021). O efeito da alcalinização da superfície de titânio no metabolismo de osteoblastos já foi demonstrado, corroborando os dados apresentados no presente estudo (MIAO *et al.*, 2017). Este efeito pode ser justificado pelo aumento da molhabilidade e da rugosidade superficial, que auxiliam na adesão e espraiamento celulares, melhorando o fenótipo das células osteogênicas (XING *et al.*, 2014; MIAO *et al.*, 2017). Tais resultados corroboram os dados obtidos neste estudo, em que houve alteração significativa da topografia e aumento da rugosidade superficial dos discos submetidos a alcalinização e aumentando assim, a adesão de osteoblastos á essas superfícies.

A análise de liberação do composto demonstrou que a naringenina foi liberada em

totalidade até 2 h depois da sua aplicação, o que permitiria sua interação com tecidos peri-implantares ainda em fases precoces do reparo tecidual.

Após a seleção de concentrações não citotóxicas da naringenina, os resultados da impregnação da superfície de Ti por meio da aplicação direta de solução aquosa demonstraram que na presença da naringenina, um maior número de células permaneceram aderidas à superfície de Ti, sendo que estas células também apresentaram maior espriamento, após 24 h. Assim, esses resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que as superfícies funcionalizadas mostram uma maior adesão celular. (CORDOBA *et al.*, 2015). Além disso, quanto cultivados sobre esta superfície (NaOH + NA) os osteoblastos apresentaram maior viabilidade.

A superfície funcionalizada com bioflavonóides promoveu a diferenciação dos osteoblastos aumentando a expressão de marcadores osteogênicos, como a atividade da fosfatase alcalina e deposição de nódulos de mineralização (CORDOBA *et al.*, 2015, assim como observado no presente estudo em que houve um aumento significativo da expressão de marcadores osteogênicos após 7 dias de contato, demonstrando que este bioflavonóide pode acelerar a deposição de matriz mineralizada e acelerar o reparo do tecido ósseo ao redor dos implantes.

Estudos prévios confirmam que com o aumento da rugosidade da superfície, obtém aumento da expressão gênica, síntese protéica e atividade de ALP dos osteoblastos (MIAO *et al.*, 2017), sendo este um marcador bioquímico da diferenciação de osteoblastos (MIRANDA *et al.*, 2016). Este estudo também avaliou a expressão genica e atividade da ALP, demonstrando que na presença de NaOH e naringenina houve um aumento significativo destes parâmetros celulares após 7 dias de contato dos osteoblastos com a superfície tratada.

No projeto em questão, o objetivo foi promover a impregnação de naringenina, para promover uma modulação da atividade de metaloproteinases da matriz e acelerar o processo de neoformação/remodelação tecidual. Estas enzimas proteolíticas atuam fisiologicamente na remodelação tecidual, porém, em altas concentrações, podem levar a uma desorganização da matriz colágena, impedindo a formação de um tecido ósseo maduro (GOMES *et al.*, 2019).

Foi observado aumento significativo da síntese de MMP-2 na presença do estímulo inflamatório com fator de necrose tumoral alfa, sendo esta síntese modulada negativamente na presença da naringenina, comprovando os efeitos deste bioflavonóide

na regulação de enzimas colagenolíticas, o que também pode estar associada a uma aceleração da fase inflamatória nos tecidos peri-implantares e pode favorecer o reparo peri-implantar (GAGGERI *et al.*, 2013).

Tendo em vista o objetivo desse estudo, obteve resultados positivos quando em contato com NAOH e a naringenina, melhorando a adesão e metabolismo de osteoblastos humanos, acelerando o reparo peri implantar e o aumento de ALP. Estes resultados podem estar relacionado com a topografia superficial, visto que houve um aumento da rugosidade devido a solução de NAOH, ocorrendo melhor adesão das células na superfície. Sugere se que a biomodificação da superfície de titânio com a naringenina pode ser positiva na aceleração do reparo peri implantar.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que a alcalinização de superfícies de titânio e a absorção da naringenina citado produzem efeitos positivos sobre osteoblastos humanos.

- Após análise da viabilidade de osteoblastos expostos a diferentes concentrações foi observado que a NA, em concentrações abaixo de 10ug/mL não apresentou efeitos citotóxicos para estas células.
- A absorção da superfície de titânio com NA resultou na formação de uma superfície bioativa, com potencial de liberação deste bioflavonóide.
- As células cultivadas sobre os discos submetidos a alcalinização e impregnação com NA apresentaram maior adesão e proliferação celulares, bem como maior síntese de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e deposição de nódulos de mineralização.
- A síntese de metaloproteinase-2 foi negativamente modulada para as células cultivadas sobre discos alcalinizados e associados à naringenina.
- Após 7 dias de contato dos discos alcalinizados e impregnados com naringenina, houve um aumento da expressão gênica de ALP.

REFERÊNCIAS

- ALLA, R. K.; GINJUPALLI, K.; UPADHYA, N.; SHAMMAS, M.; RAVI, R. K.; SEKHAR, R. Surface roughness of implants: A review. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs.**, v. 25, n. 3, p. 112-118, 2011.
- CAI, K.; BOSSERT, J.; JANDT KD. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? **Colloids and Surfaces: B Biointerials**, v. 49, p. 136 – 144, 2006.
- BRÅNEMARK, P. I.; HANSSON, B. O. ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; HALLÉN, O. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstruction Surgery - Supplementum** v. 16, p. 1-132, 1977.
- CAMARGO, W. A., TAKEMOTO, S; HOEKSTRA, J. W., LEEUWENBURGH, S., JANSEN, J. A., VAN DEN BEUCKEN, J., & ALGHAMDI, H. S. Effect of surface alkali-based treatment of titanium implants on ability to promote in vitro mineralization and in vivo bone formation. **Acta Biomaterialia.**, v. 57, p. 511–523, 2017.
- CÓRDOBA, A.; SATUÉ, M.;GÓMEZ-FLORIT, M.; HIERRO-OLIVA, M.; PETZOLD, C.; LYNGSTADAAS, S. P.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M. L.; MONJO, M.; & RAMIS, J. M. Flavonoid-modified surfaces: multifunctional bioactive biomaterials with osteopromotive, anti-inflammatory, and anti-fibrotic potential. **Advanced Healthcare Materials.**, v.4, p.540–549, 2015.
- ENGEL, E.; MICHIARDI, A.; NAVARRO, M.; LACROIX, D.; & PLANELL, J. A. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. **Trends in Biotechnology.**, v. 26, n. 1, p.39–47, 2008.
- GAGGERI, R.; ROSSI, D.; DAGLIA, M.; LEONI, F.; AVANZINI, M. A.; MANTELLI, M.; JUZA, M.; & COLLINA, S. An eco-friendly enantioselective access to (R)-naringenin as inhibitor of proinflammatory cytokine release. **Chemistry & Biodiversity**, v.10, p. 1531 – 1538, 2013.
- GOMES, A.; OLIVEIRA, DWD.; FERREIRA ,SD.; Periodontal disease, peri-implant disease and levels of salivary biomarkers IL-1beta, IL-10, RNL, OPG, MMP-2, TGF-beta and TNF-alpha: follow up over 5 years. **Journal of Applied Oral Sciences.** v. 21, p. e20180316, 2019.
- KOKUBO, T.; KIM, H.-M.; KAWASHITA, M.; NAKAMURA. T. REVIEW Bioactive metals: preparation and properties. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 2, p. 99–107, 2004.
- KULLAR, A. S.; MILLER, C. S. Are there contraindications for placing dental implants? **Dental Clinics of North America**, v. 63, p. 345-362, 2019.

LARSSON, C.; THOMSEN, P.; ARONSSON, B.-O.; RODAHL, M.; LAUSMAA, J.; KASEMO, B.; & ERICSON, L. E. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. **Biomaterials**, v. 17, n. 6, p. 605–616, 1996.

MARISCAL-MUÑOZ, E.; COSTA, C. A. S.; TAVARES, H. S.; BIANCHI, J.; HEBLING, J.; MACHADO, J. P. B.; LERNER, U. H.; SOUZA, P. P. C. Osteoblast differentiation is enhanced by a nano-to-micro hybrid titanium surface created by Yb:YAG laser irradiation. **Clinical Oral Investigations**, v. 39, n. 3, p. 202-211, 2015.

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

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

PANSANI, T. N.; PHAN, T. H.; LEI, Q.; KONDYURIN, A.; KALIONIS, B.; CHRZANOWSKI, W. Extracellular Vesicle-Based Coatings Enhance Bioactivity of Titanium Implants: surfev. **Nanomaterials**, v. 11, n. 6, p. 1445, 2021.

ROMANOS ,GE.; DELGADO,-RUIZ, R.; SCULEAN ,A. Concepts for prevention of complications in implant therapy. **Periodontology**, v. 81, p. 7-17, 2019.

ROSS, A. M.; JIANG, Z.; BASTMEYER, M.; LAHANN, J.. Physical Aspects of Cell Culture Substrates: Topography, Roughness, and Elasticity. **Small**, v. 8, n. 3, p. 336-355, 2012.

Standardization IOF. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Switzerland: International Organization for Standardization – Geneva, p. 1-33, 2009.

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

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

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

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v.25, n.1, p. 63-74, 2010.

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

XU, M.L.; BI, C.W.C.; KONG, A.Y.Y.; DONG, T.T.X.; WONG, Y.H.; TSIM, K.W.K. Flavonoids induce the expression of acetylcholinesterase in cultured osteoblasts. **Chemico-Biological Interactions**, v. 25, p. 295 – 300, 2016.

YAMAGUCHI, S.; NATH, S.; SUGAWARA, Y.; DIVAKARLA, K.; DAS, T.; MANOS, J.; CHRZANOWSKI, W.; MATSUSHITA, T.; KOKUBO, T. Two-in-One Biointerfaces: Antimicrobial and Bioactive Nanoporous Gallium Titanate Layers for Titanium Implants. **Nanomaterials**, v. 20, n. 8, p. 229, 2017.

YAO, Y.; CHEN, S.; & LI, H. An Improved System to Evaluate Superoxide-Scavenging Effects of Bioflavonoids. **Chemistry Open**, v.10, n.4, p. 503–514, 2021.

ZENG, Y.; YANG, Y.; CHEN, L. Optimized surface characteristics and enhanced in vivo osseointegration of alkali-treated titanium with nanonetwork structures. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, p.1127 – 1142, 2019.