

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

TALITA CAIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS
SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO SUBMETIDAS A DIFERENTES
TRATAMENTOS ALCALINOS COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO**

Ribeirão Preto
2022

Talita Caira Silva

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS
SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO SUBMETIDAS A DIFERENTES
TRATAMENTOS ALCALINOS COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO**

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

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

Ribeirão Preto
2022

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS
SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO SUBMETIDAS A DIFERENTES
TRATAMENTOS ALCALINOS COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

S151a

Silva, Talita Caira, 1985.

Avaliação do metabolismo de osteoblastos humanos sobre
superfícies de titânio submetidas a diferentes tratamentos alcalinos
com hidróxido de sódio /Talita Caira Silva- -
Ribeirão Preto, 2022.
50 f.: il. color.

Orientadora: Prof. Dra.Fernanda Gonçalves Basso.

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

1. Tratamento de superfície 2. Titânio. 3. Hidróxido de sódio.

TALITA CAIRA SILVA

**"AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS
SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO SUBMETIDAS A DIFERENTES
TRATAMENTOS ALCALINOS COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO"**

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

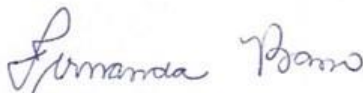
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves
Basso Lombardi

Área de concentração: Implantodontia

Data de defesa: 12 de abril de 2022

Resultado: APROVADA

BANCA EXAMINADORA



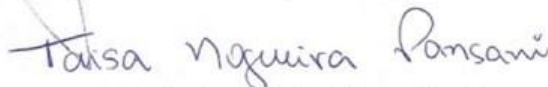
Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso Lombardi

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



Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa

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



Profa. Dra. Taisa Nogueira Pansani

Pós-Doutoranda da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP)

Dedico este trabalho primeiramente à **Deus**, por ser tão presente no meu coração, por me amparar e ajudar a desenvolver o meu propósito maior. Por toda coragem, luz, determinação e força durante essa nova fase da minha vida.

Ao meu noivo **Daniel Augusto Ferrari** por todo amor, paciência e companheirismo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora **Prof. Dra. Fernanda Gonçalves Basso**, por ser o meu espelho de profissional. Por me ensinar, educar, instruir e ser o meu grande incentivador e encorajador nessa jornada acadêmica. Por sempre ter muita paciência, respeito, altruísmo e compreensão. Sou profundamente grata a Deus por ter tido essa oportunidade de ser conduzida por você.

AGRADECIMENTOS

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

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara T. C. Silva Sousa**, por toda sua atenção.

Ao **corpo docente** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto: **Prof. Dr. André Pitondo da Silva, Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda, Prof. Dra. Danielle C. Furtado Messias, Prof. Dr. Edson Alfredo, Prof. Dra. Erica Alves Gomes, Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso Lombardi, Prof. Dr. Fuad Jacob Abi Rached Juior, , Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni, Profa. Dra. Izabela Cristina Mauricio Moris, Profa. Dra. Larissa M. S. C. Raucci, Prof. Dra. Marcelle Danelon, Prof. Dr. Walter Raucci Neto e Profa. Dra. Yara T. Corrêa Silva Sousa**, pelos ensinamentos transmitidos.

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

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo auxílio regular à pesquisa, Processo nº 408392/2016-9. À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP)**, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

*“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto,
é a coisa mais preciosa que temos. ”*

(Albert Einstein)

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento de osteoblastos humanos cultivados sobre superfícies de titânio polidas ou submetidas a dois protocolos de modificação de superfície por meio de tratamento térmico alcalino com hidróxido de sódio (NaOH). Discos de titânio polidos manualmente foram submetidos ao protocolo de alcalinização com NaOH a 60°C ou 120°C. A seguir, foram avaliadas a topografia e rugosidade superficiais por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os discos foram posicionados em placas de 24 compartimentos e sobre estes foram cultivados osteoblastos humanos (SaOs-2). A adesão das células aos substratos e a viabilidade celular foram determinadas após 24 e 48 h. Após 7 dias foram avaliadas a síntese proteína total e de colágeno, e a atividade de fosfatase alcalina (ALP). Também foi avaliada a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória (fator de necrose tumoral alfa – TNF- e betadefensina3 - HBD3), após estímulo inflamatório com lipopolissacarídeos (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* (1 µg/mL) por 4 h. A análise da rugosidade superficial demonstrou que os discos submetidos à modificação com NaOH em diferentes temperaturas demonstrou maiores irregularidades, especialmente para a imersão à 120°C. Análise da morfologia celular por meio de MEV demonstrou maior número de células aderidas às superfícies tratadas com solução de NaOH, sem diferença entre os protocolos. Os osteoblastos cultivados sobre as superfícies tratadas apresentaram maior viabilidade celular quando comparados às células cultivadas sobre os discos de titânio polidos, para ambos os períodos de análise (24 e 48 h), sem diferença entre os protocolos de tratamento, assim como maior síntese de proteína total, colágeno e atividade de ALP. A análise da resposta dos osteoblastos frente à exposição ao LPS demonstrou aumento da expressão genica de TNF-alfa por estas células quando cultivadas sobre os discos polidos. Para os discos tratados com NaOH, não houve diferença entre os grupos expostos ou não ao LPS. Quanto à expressão de HBD3, todos os grupos apresentaram aumento desta expressão na presença do LPS, sendo mais evidente nos discos submetidos ao tratamento com NaOH a 60°C. Portanto, a modificação dos discos de titânio com NaOH a 60°C ou 120°C promoveu aumento da adesão e metabolismo dos osteoblastos, além de favorecer a resposta frente a estímulo inflamatório.

Palavras-chave: Tratamento de superfície. Titânio. Hidróxido de sódio.

ABSTRACT

The main objective of this study was to evaluate the behavior of human osteoblasts grown onto polished titanium surfaces or submitted to two surface modification protocols through alkaline heat treatment with sodium hydroxide (NaOH). Manually polished titanium discs were submitted to alkali treatment at 60°C or 120°C. Then, surface roughness and topography were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Discs were placed in 24-well plates and osteoblasts were seeded onto them. Cell adhesion to substrates and cell viability were evaluated at 24 and 48 h. After 7 days, total protein and collagen synthesis as also alkaline phosphatase (ALP) activity were also analyzed. The expression of genes related to inflammatory response (tumoral necrosis factor alpha - TNF-alpha – and betadefensin3 - HBD3) after exposure to inflammatory stimulus with *Porphyromonas gingivalis* (1 µg/mL) lipopolissacharides (LPS) for 4 h was also demonstrated. Evaluation of the topography and roughness surface of discs submitted to alkaline heat treatment with NaOH at different temperatures, bigger irregularities were observed for the treated groups, especially for the discs submitted to 120°C. Analysis of cell morphology through SEM, demonstrated a higher number of cells adhered at the surfaces treated with NaOH solution with no differences between them. Osteoblasts seeded on the treated surfaces demonstrated increased cell viability when compared to these cells cultured on polished titanium discs for both analysis period (24 and 48 hours), with no difference between the treatment protocols, as also observed for total protein and collagen synthesis and ALP activity. Analysis on the osteoblasts response to LPS when grown on different surfaces demonstrated an increase in gene expression of TNF-alpha for these cells, when cultured on polished discs. For the discs treated with NaOH there were no difference between the exposed groups or not to LPS. HBD3 expression was increased for all groups in the presence of LPS, being this expression more evident to the group of discs submitted to treatment with NaOH at 60°C. Therefore, surface modification with NaOH at 60°C or 120°C increases adhesion and metabolism of osteoblasts and favors response of these cells to inflammatory stimulus.

Keywords: Surface treatment. Titanium. Dental implant.

SUMÁRIO

ABSTRACT.....	8
1-INTRODUÇÃO.....	11
2. PROPOSIÇÃO	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.1.1 Objetivos Específicos	14
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	15
3.2 OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO	16
3.3 PROTOCOLOS DE MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE	17
3.4 AVALIAÇÃO DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE SUPERFICIAL	18
3.5 CULTURA DE OSTEÓBLASTOS	18
3.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR.....	21
3.7 ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR	22
3.8 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	23
3.9 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO	24
3.10 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL	25
3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ALP	26
3.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TNF-ALFA E BETA- DEFENSINA.....	27
3.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	28
4.RESULTADOS.....	29
4.1 AVALIAÇÃO DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE SUPERFICIAL	29
4.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR.....	30
4.3 ANÁLISE DA ADESAO CELULAR.	31
4.4 VIABILIDADE CELULAR.	34
4.5 SÍNTESE DE COLÁGENO	35
4.6 PRODUÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	35
4.7 ATIVIDADE DE ALP	36
4.8 EXPRESSÃO GÊNICA.....	37
5. DISCUSSÃO	38
6.CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44

1-INTRODUÇÃO

A Odontologia enfrenta um grande desafio, a reabilitação de perdas dentárias totais ou parciais, representa um grande desafio na clínica odontológica, uma vez que grande parte da população apresenta perdas dentárias múltiplas, que podem comprometer a capacidade fonética, mastigatória estética, social e até mesmo psicológica (COOPER, 2009).

O precursor dos implantes dentários, Brånemark, foi o pioneiro ao relatar um fenômeno que foi chamado de osseointegração e introduzi-lo na área da Odontologia reabilitadora, que se refere a área da Odontologia que atua na reparação ou substituição de dentes, coroas e implante dentais, os métodos vêm avançando com prótese tipo protocolo até unitárias fixas, hoje o paciente possui mais possibilidades de tratamento (AHILA *et al.*, 2019).

O processo de osseointegração consiste na íntima interação entre o implante, e o osso alveolar, capaz de suportar forças mastigatórias. A formação de tecido ósseo ao redor dos implantes é mediada principalmente por células osteogênicas (NUNES, 2016). Este processo envolve diversos eventos celulares e moleculares, que se iniciam com formação de tecido de granulação e ativação da cascata hemostática, a seguir, por uma resposta imune inata, mediada por macrófagos, com o objetivo de eliminar possíveis patógenos e debris teciduais (MAVROGENIS, *et al.*, 2009). Ao final desta fase inflamatória, inicia-se a fase reparadora, caracterizada por neovascularização e liberação de fatores de crescimento, como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), proteína morfogenética óssea, entre outros, que estimulam a migração e a diferenciação de células osteogênicas. Tais células iniciam a deposição de matriz extracelular, rica em colágeno tipo I, seguida da mineralização e remodelação. A osteogênese de contato ocorre a partir de células diretamente em contato com o implante, enquanto a osteogênese à distância se desenvolve no tecido ao redor do sítio de instalação do implante (LIU *et al.*, 2005).

O processo de osseointegração pode ser afetado por diversos fatores, como morfologia e vascularização ósseas, condição dos tecidos periodontais, condições sistêmicas e uso de medicamentos (KULLAR & MILLER, 2019). Além dos fatores relacionados ao paciente, tipo de material, bem como topografia e composição química das superfícies dos implantes também podem interferir diretamente no processo de

neoformação óssea e reparo peri-implantar (LEE *et al.*, 2015).

O titânio excelente biomaterial como padrão ouro para implantes intra-ósseos na substituição de elementos dentais (SIDDIQI *et al.*, 2011). Este material tem demonstrado boa compatibilidade, resistência a compressão e à corrosão (INSUA *et al.*, 2017). Inúmeros estudos já demonstraram que o aumento da rugosidade superficial dos implantes dentários favorece o reparo dos tecidos peri-implantares (FLAMANT *et al.*, 2016; ZAHRAN *et al.*, 2016), por meio de aumento da molhabilidade, a adesão celular e a osseointegração, por meio de aumento do ângulo de contato do material com o tecido receptor, permitindo também maior embricamento mecânico com a matriz óssea (DEGASNE *et al.*, 1999; GERZON *et al.*, 2013).

Assim, a constante busca por condições que favoreçam a neoformação óssea ao redor dos implantes tem estimulado o desenvolvimento de diferentes tratamentos de superfície para os implantes dentários de titânio, com o objetivo de melhorar a adesão, espraçamento e diferenciação dos osteoblastos na interface do implante (SHIBLI *et al.*, 2019; TRENTON *et al.*, 2020).

Diversas modificações de superfície foram propostas e avaliadas, como adição de cristais de hidroxiapatita e outros jateamentos (ALLA *et al.*, 2011), tratamentos com laser de alta intensidade (MARISCAL-MUÑOZ *et al.*, 2013) por tratamentos ácidos (LARSSON *et al.*, 1996) e tratamentos alcalinos (KOKUBO *et al.*, 2007). Dentre estas opções, o tratamento alcalino apresenta-se como uma alternativa interessante, pois além de promover uma alteração de topografia superficial e molhabilidade, esta modificação também favorece a interação da superfície com moléculas orgânicas, aumentando a adsorção de proteínas (CLAUDY, 2015) por deposição de matriz mineralizada (MIAO *et al.*, 2017; ANSAR *et al.*, 2019; LIDDELL *et al.*, 2021). Os efeitos desta modificação vêm sendo elucidados há aproximadamente 10 anos, sendo que diversos protocolos de alcalinização já foram avaliados e padronizados quanto à composição, tempo de exposição. Atualmente, a alcalinização por imersão térmica em solução de hidróxido de sódio (NaOH) apresenta-se como uma alternativa promissora (ZENG *et al.*, 2019).

Além de acelerar o processo de osseointegração, as modificações de superfícies de titânio podem atuar na resposta dos tecidos peri-implantares frente a uma inflamação peri-implantar (CUI *et al.*, 2017).

A doença peri-implantar, se caracteriza pela presença de reações inflamatórias que afetam os tecidos peri-implantares sob função, ou seja, após receber a prótese implanto

ou muco-implanto suportada (ZITZMANN *et al.*, 2001). Os sinais clínicos variam desde uma inflamação restrita à mucosa peri-implantar, mucosite até sangramento a sondagem, supuração, perda clínica de inserção e óssea em forma de taça observada em radiografia (SHIBLI *et al* 2003; CARAMÊS *et al.*, 2019; SCHWARZ *et al.*, 2019).

Avaliações microbiológicas de doenças peri-implantares demonstraram a presença de diferentes patógenos, organizados em biofilmes duplos ou ainda multiespécies (LAFAURIE *et al.*, 2017). A disbiose entre esta microbiota e seus produtos e o hospedeiro resulta em aumento da expressão de mediadores inflamatórios, que atuam como potentes indutores da resposta inflamatória e podem estar direta ou indiretamente relacionados ao metabolismo e remodelação óssea (SHIBLI *et al.*, 2008).

Desta forma, a modulação da resposta tecidual por meio de modificações de superfície, criando superfícies bioativas, poderia resultar na aceleração do processo de reparo peri-implantar e também auxiliar na manutenção da homeostasia dos tecidos peri-implantares, além de melhorar a capacidade de resposta a estímulos inflamatórios/infecciosos.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento de osteoblastos humanos, utilizando um modelo de implantodontia in vitro, cultivados sobre superfícies de titânio polidas ou submetidas a dois protocolos de modificação de superfície por meio de tratamento térmico alcalino com hidróxido de sódio (NaOH).

2.1.1 Objetivos específicos

Avaliar topografia e rugosidade dos discos de titânio submetidos aos protocolos de modificação superficial por meio de alcalinização com NaOH (5M) a 60°C e 120°C.

Avaliar o efeito da modificação superficial de discos de titânio por meio de alcalinização com NaOH (5M) a 60°C e 120°C sobre a resposta de osteoblastos, quanto à:

- Adesão às diferentes superfícies por 24 e 48 h;
- Viabilidade celular por 24 e 48 h;
- Síntese de colágeno por 7 dias;
- Produção de proteína total, por 7 dias;
- Atividade de fosfatase alcalina por 7 dias;
- A expressão gênica de mediadores inflamatórios por osteoblastos cultivados sobre as diferentes superfícies e expostos ao estímulo inflamatório com lipopolissacarídeos (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* (1µg/mL) por 4 h.

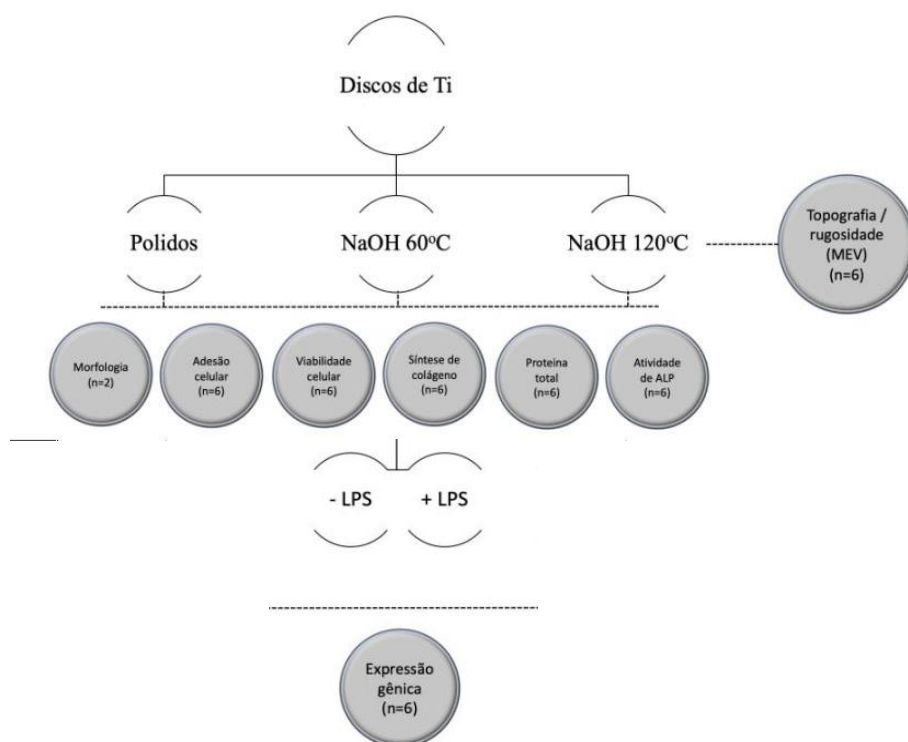
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.

Este estudo foi realizado utilizando modelo de cultura de células sobre discos de titânio (Ti) polidos ou submetidos à modificação de superfície por meio do tratamento térmico alcalino com hidróxido de sódio (NaOH). Foram utilizados 42 discos de titânio.

Os fatores do estudo foram: discos de titânio polidos, discos de titânio submetidos à modificação com NaOH a 60°C e discos de titânio submetidos à modificação com NaOH a 120°C, e presença ou ausência de lipopolissacarídeo (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). As variáveis respostas incluíram avaliação da rugosidade superficial, morfologia celular, adesão celular, viabilidade celular, síntese de colágeno, produção de proteína total, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e expressão gênica de TNF-alfa e beta-defensina3 (Figura 1).

Como hipótese nula do estudo, foi considerada a ausência de diferenças na resposta dos osteoblastos quando cultivados sobre as diferentes superfícies.

Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental

Fonte: autor

3.2 OBTENÇÃO E PADROIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO.

Discos de titânio com 2mm de espessura foram obtidos por usinagem (BASSO *et al*, 2018; BASSO *et al*, 2020), a partir de cilindros de titânio grau 2, com 25cm de comprimento e 13mm de diâmetro (Realum Industria e Comercio de Metais Puros e Liga, São Paulo, SP, Brasil).

Os discos foram submetidos a polimento manual utilizando lixas d'água, de granulações 400, 600 e 1200 (T469-SF- Norton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil). Submetidos à limpeza para eliminação de fragmentos de titânio e material orgânico superficiais, em soluções de acetona P.A., água deionizada, etanol 100% e água deionizada, por 15 minutos, respectivamente, em cuba ultrassônica (BASSO *et al.*, 2018; BASSO *et al.*, 2020).

3.3 PROTOCOLOS DE MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE.

Foram avaliadas diferentes superfícies de titânio: a superfície polida, considerada como grupo controle, cuja obtenção foi realizada a partir do polimento inicial dos discos de titânio, conforme descrito anteriormente; e as superfícies submetidas à modificação com tratamento térmico alcalino com NaOH em duas temperaturas distintas, 60°C e 120°C, conforme descrito a seguir:

Foi preparada solução de NaOH a 5M (5 mol/L) (Sigma-ALdrich, St Louis, MO, EUA) em água deionizada. A seguir, após polimento inicial, limpeza e esterilização por meio de autoclave, os discos de titânio foram imersos nesta solução e submetidos a incubação por 24 h a 60°C ou 120°C, sob agitação (CAMARGO *et al.*, 2017) (Figura 2).

Após o tratamento hidrotérmico, os discos foram lavados em água deionizada estéril por 15 minutos.

Figura 2. Esquema representativo do tratamento alcalino dos discos de titânio.

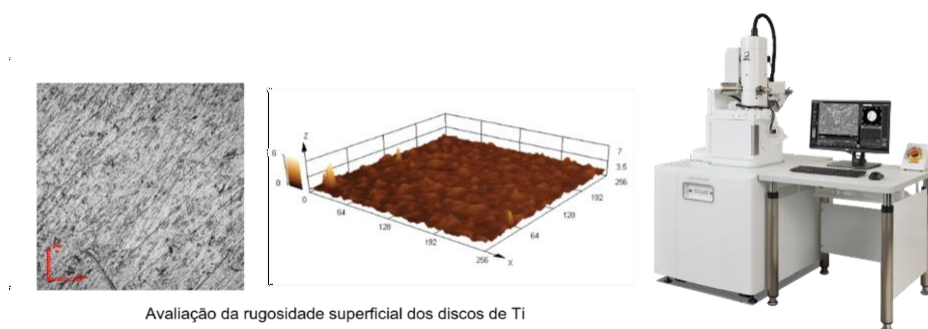


Fonte: autor

3.4 AVALIAÇÃO DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE SUPERFICIAL.

A topografia e a rugosidade superficial dos discos de titânio polidos ou submetidos a modificação de superfície por meio do tratamento térmico alcalino com NaOH nas diferentes temperaturas foram determinadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), associada análise em software ImageJ. Para tanto, os discos foram submetidos a metalização por ouro e avaliados em microscópio eletrônico de varredura (Inspect Scanning Electron Microscope - S50; FEI, Hillsboro, OR, EUA) com magnificação aumento 10.000x. As fotomicrografias obtidas foram analisadas em Image J, utilizando os Plugins “analyze-measure/ surface plot”. A topografia superficial foi determinada por meio de análise qualitativa. Para a análise quantitativa da rugosidade superficial, foram avaliadas cinco regiões lineares equidistantes de cada amostra (replicatas), cuja valor médio foi considerado como valor de rugosidade superficial do disco (unidade amostral, n=6) (Figura 3).

Figura 3. Esquema representativo da análise da topografia e rugosidade superficiais.



Fonte: autor

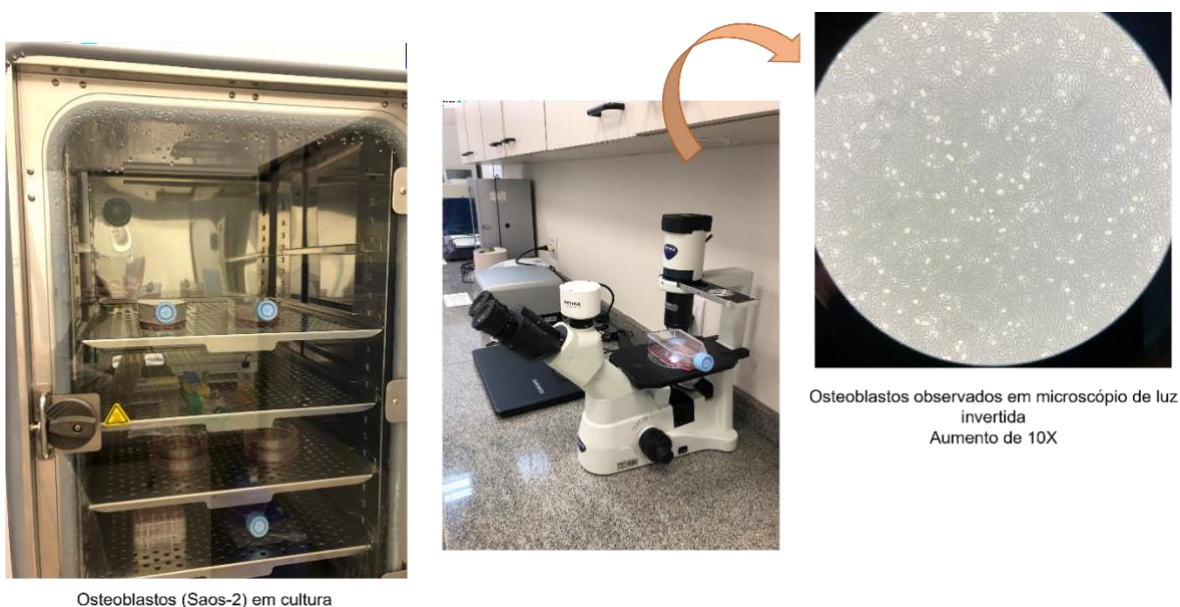
3.5 CULTURA DE OSTEOLASTOS.

Para este estudo, foi utilizada a linhagem de osteoblastos humanos SaOs-2 (American Cell Culture - ATCC# HTB85). As células foram mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Culture Medium DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 1% de

solução antibiótica (PenStrep, Gibco) e 10% de soro fetal bovino (SFB-Gibco). Após descongelamento, as células foram mantidas em incubadora a 5% de CO₂ e a 37°C.

Os procedimentos de subcultivo foram realizados a cada 72 h utilizando tripsina/EDTA 0,25% (Gibco). Foram realizados 2 procedimentos de subcultivo até o momento da realização do o experimento (BASSO *et al.*, 2020) (Figura 4).

Figura 4. Cultura de células em incubação a 37°C e 5% de CO₂ e fotomicrografia dos osteoblastos em microscopia invertida.



Fonte: autor

Previamente ao cultivo celular, os discos foram esterilizados em autoclave e alocados em placas de cultura de células de 24 compartimentos (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil). O diâmetro dos discos permitiu que estes ocupassem todo o fundo do compartimento, garantindo que as células permanecessem aderidas apenas aos discos. Para as avaliações, os discos foram transferidos para novas placas de 24 compartimentos.

Foi utilizado o modelo de implantodontia *in vitro*, no qual as células foram cultivadas sobre discos de titânio previamente, visando simular o contato dos osteoblastos

com os implantes orais. Este modelo permite maior mimetização da resposta das células em contato direto com os materiais/superfícies a serem avaliados (BASSO *et al.*, 2020; PANSANI *et al.*, 2021; BASSO *et al.*, 2021) (Figura 5).

Figura 5. Discos de titânio alocados em placas de 24 compartimentos em meio de cultura DMEM completo, seguido do cultivo dos osteoblastos.



Fonte: autor

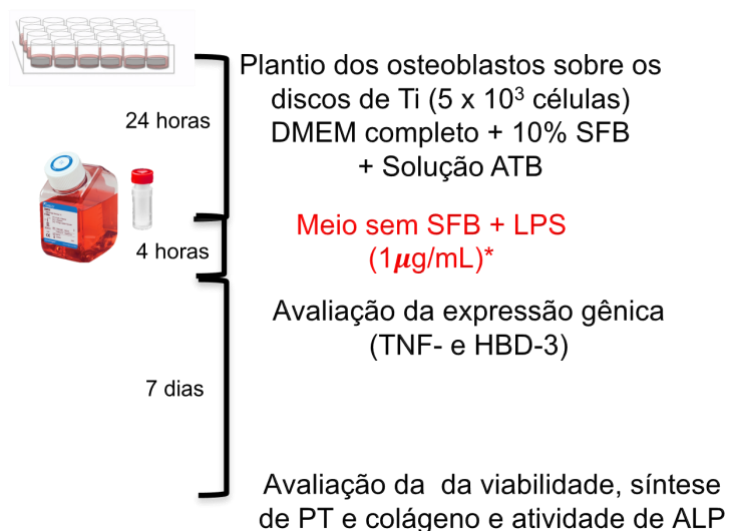
Para a realização dos protocolos experimentais, após alocar os discos em placas de 24 compartimentos, foi adicionado 1mL de meio de cultura DMEM, contendo 1% de solução antibiótica (PenStrep, Gibco) e 10% de SFB (Gibco) em cada compartimento da placa. A seguir, as células foram submetidas a desagregação (tripsina/EDTA 0,25% , Gibco), contadas e transferidas para as superfícies dos discos na densidade de $\times 10^4$ células por disco.

As placas foram então colocadas em incubadora a 37°C e tensão de 5% de CO₂ por 24 ou 48 h, para a realização das análises de morfologia, adesão e viabilidade celular. Para os protocolos realizados após 7 dias, após 24 h, o meio de cultura foi substituído por um meio fresco, livre de SFB, que foi substituído a cada 48 h, até que os 7 dias fossem completos (Figura 4).

Para avaliação da expressão gênica, as células foram cultivadas sobre os discos em DMEM completo e mantidas por 24 h. A seguir, foram expostas ao estímulo inflamatório com LPS de *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) (1µg/mL) em meio

livre de SFB por 4 h. Após este período, as amostras foram coletadas para avaliação da expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e beta-defensina 3 (HBD3) (Figura 6).

Figura 6. Esquema representativo do delineamento experimental.



Fonte: autor

3.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR.

A morfologia dos osteoblastos aderidos às diferentes superfícies de titânio foi analisada por meio de MEV ($n=2$). Após 24 e 48 h do cultivo sobre as diferentes superfícies, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% por 1 hora, seguido de pós-fixação com tetróxido de ósmio 1%, por uma hora.

A seguir, as amostras foram lavadas em água deionizada e submetidas à desidratação com concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 95 e 100%), por trinta minutos cada uma e finalmente, submetidas à secagem química com 1,1,1,3,3,3 Hexamethyldisilazane (HMDS – Sigma-Aldrich), por 20 minutos, por 3 repetições. Após estes procedimentos, os discos de titânio foram metalizados com ouro e analisados em microscópio eletrônico de varredura (Inspect Scanning Electron Microscope-S50, FEI,

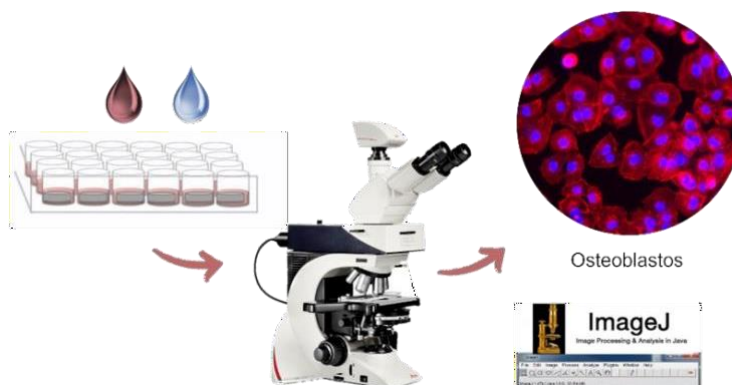
Hillsboro, OR, EUA), com magnificação de 1000x e 5000x. Para esta análise, foram considerados parâmetros de morfologia e espreadimento das células sobre os substratos, bem como a densidade celular sobre cada substrato.

3.7 ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR.

A adesão dos osteoblastos às superfícies de titânio foi determinada por fluorescência direta, nos períodos de 24 e 48 h após cultivo, utilizando um marcador de citoesqueleto (Actin Red, Invitrogen 650nm) e um intercalante de DNA (Hoescht, Invitrogen) (n=6). Em cada período proposto, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, seguido de lavagem em PBS 1x, permeabilização com Triton x-100 (0,1% - Sigma-Aldrich) e incubação com Actin Red por 30 minutos. A seguir, as células foram novamente lavadas em tampão fosfato e submetidas a marcação nuclear com Hoescht (1:5000) por 15 minutos.

As amostras foram qualitativamente analisadas em microscopia de fluorescência (Leica DM6000, Leica Microsystems, Wetzlar, GE). Quatro campos de cada amostra foram fotografados e analisados quantitativamente em software ImageJ (Figura 7).

Figura 7. Esquema representativo da análise da adesão dos osteoblastos às superfcies avaliadas.

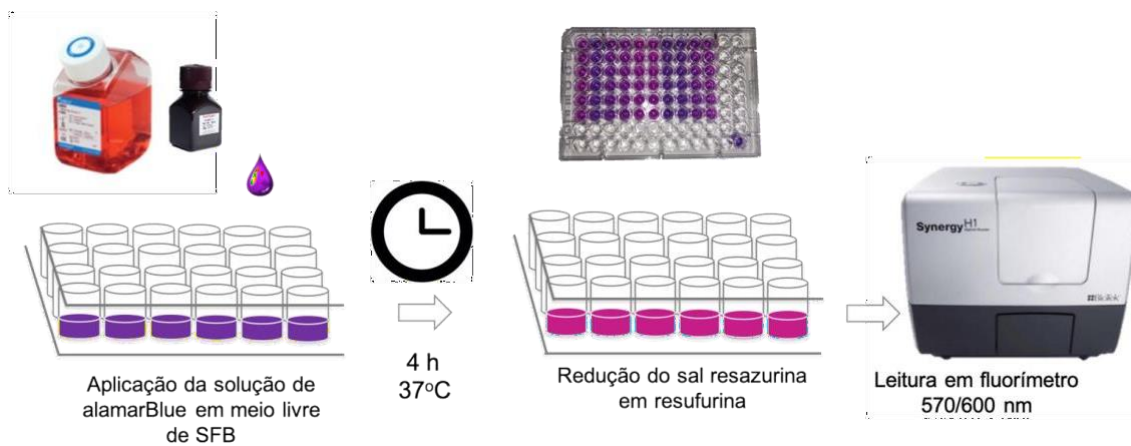


Fonte: autor

3.8 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.

A viabilidade dos osteoblastos foi determinada utilizando o ensaio PrestoBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Este ensaio é baseado na oxirredução da resazurina em resorufina, sendo que esta produz uma emissão de fluorescência diretamente proporcional ao número de células viáveis (CARDOSO *et al.*, 2020). Desta forma, a solução PrestoBlue foi adicionada às células na concentração de 10% em meio DMEM livre de SFB. Após 10 minutos de incubação a 37°C, foi determinada a intensidade de fluorescência (560nm/590nm - (Synergy H1 Hybrid Multi-mode Microplate Reader – Biotek, Winooski, VT, EUA). A média dos resultados obtidos para o grupo de discos polidos foi considerada como 100% de viabilidade e todos os grupos foram avaliados em comparação a este (Figura 8).

Figura 8. Esquema representativo da análise da viabilidade celular.



Fonte: autor

3.9 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO.

A síntese de colágeno foi determinada por meio do ensaio Sirius Red (BASSO *et al.*, 2018). Para esta análise, o meio de cultura em contato com as células foi coletado e armazenado a -20°C até o momento do teste. Foram utilizados 200 μL do meio de cultura, que foram adicionados a um tubo contendo 200 μL do reagente Direct Red 0,1% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Esta solução foi então incubada sob agitação por 1 hora (400 rpm - Thermomixer – Eppendorf, Hamburg, Alemanha), a temperatura ambiente (25°C). Após esta incubação, as amostras foram centrifugadas a 10^4 rpm por 10 min (Microcentrifugal 5415R, Eppendorf, Hamburg, Alemanha), sendo obtido um *pellet*, que foi lavado em solução de ácido clorídrico (0,1 mol/L) e submetido a nova centrifugação, nos mesmos parâmetros. Por fim, o *pellet* foi solubilizado em solução de hidróxido de sódio (0,5 mol/L). Três aliquotas de 100 μL de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) e avaliadas por meio de espectrofotômetro a 555nm (Synergy H1) (Figura 9).

Figura 9. Esquema representativo da análise da síntese de colágeno.

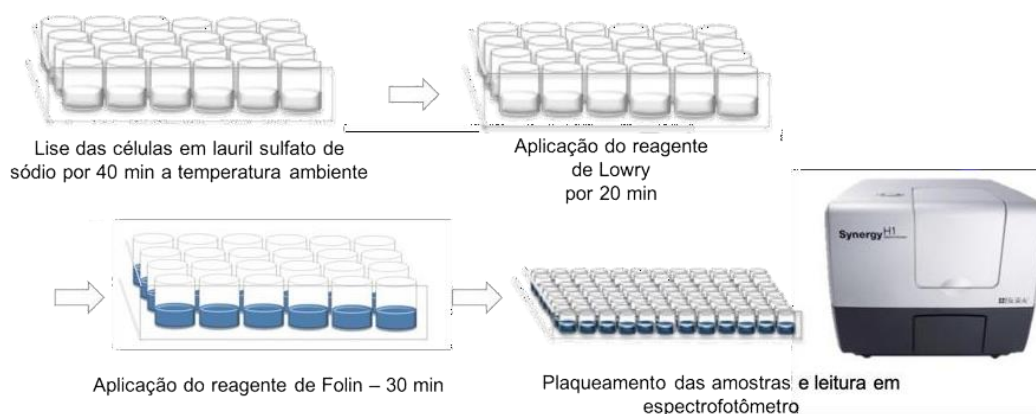


Fonte: autor

3.10 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.

Para determinar a produção de proteína total por osteoblastos cultivados sobre as diferentes superfícies, as células foram lisadas em 1 mL lauril sulfato de sódio 0,1% a temperatura ambiente (25°C), por 40 min. A seguir, foi adicionado 1 mL da solução de Lowry, seguido de incubação por 20 minutos. Por fim, foi adicionado 0,5 mL do reagente Folin & Ciocalteu's Phenol, previamente diluído em água deionizada (1:5). Após incubação por 30 min em ausência de luz, três alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp.) e as amostras foram submetidas a avaliação em espectrofotômetro, a 655 nm (Synergy) (LEITE *et al.*, 2017). A concentração de proteína total foi determinada a partir de curva padrão contendo concentrações previamente estabelecidas de albumina bovina (Sigma-Aldrich) Figura 10).

Figura 10. Esquema representativo da análise produção de proteína total



Fonte: autor

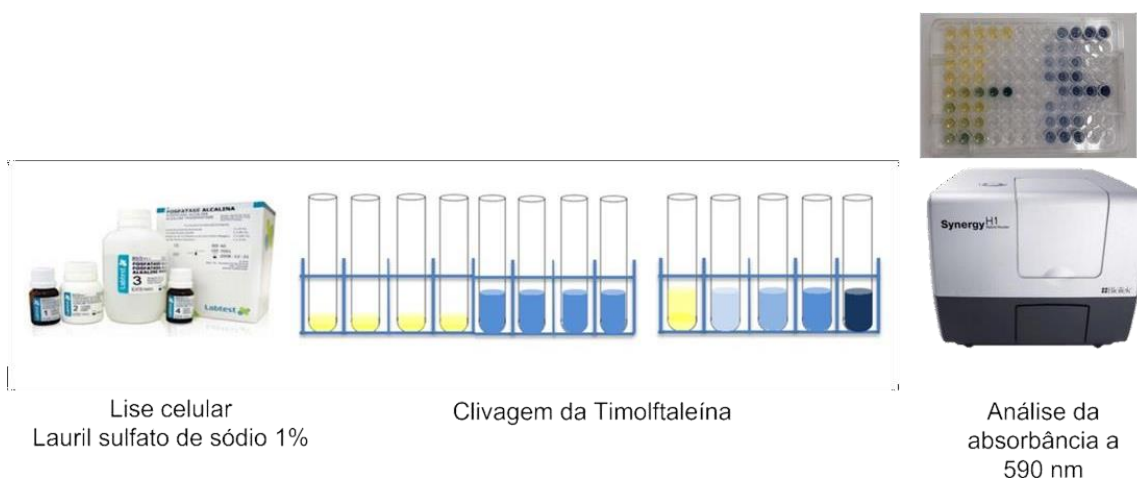
3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ALP.

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada seguindo um ensaio de ponto final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) (BASSO *et al.*, 2018). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. A fosfatase alcalina hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína. Assim, é possível medir-se diretamente o produto da hidrólise, alterando-se o pH, promovendo a interrupção da atividade enzimática e a formação de cor azul característica do produto da reação, que é medida fotometricamente. Para esta avaliação, foi utilizado o produto da lise celular obtido durante a análise da produção de proteína total, conforme citado no protocolo de quantificação de produção de proteína total.

A reação foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante, utilizado 50 µL de cada amostra, seguido de incubação a 37°C por 10 min. Após este período, foram acrescentados 2 mL de reagente colorimétrico (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L – reagente). Após verificação da homogeneidade das soluções, três alíquotas de 100 µL de cada amostra foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp.).

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (Synergy H1), no comprimento de onda de 590 nm. A atividade de fosfatase alcalina foi calculada utilizando uma curva padrão com valores pré-determinados da enzima, estabelecidos a partir do reagente padrão fornecido pelo kit. Os resultados da atividade de ALP foram normalizados pela produção de proteína total de cada amostra (Figura 11).

Figura 11. Esquema representativo da análise da atividade de ALP.



Fonte: autor

3.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GENICA DE TNF-ALFA E BETA-DEFENSINA.

O isolamento do RNA total foi realizado utilizando o Kit RNAqueous (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), por meio de um sistema de filtração. A seguir, a concentração de RNA de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro (Take 3 System – Synergy H1). Para cada amostra de RNA COLOCAR PRIMERS obtida, foi sintetizado o cDNA 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 (∞).

Após a síntese de cDNA, foi avaliada a expressão dos genes que codificam o fator de necrose tumoral alfa e a beta defensina-3, por meio de PCR quantitativo. 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. As leituras de fluorescência serão 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). Os dados referentes aos primers utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados para a análise da expressão gênica.

Gene alvo	Primers
HBD3	Foward - 5'- GCTATGAGGATCCATTATCTTCTG-3' Reverse – 3'- TTATTTCTTTCTTCGGCAGCATTTTC -5'
TNF-alfa	Primer foward 5'-CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC-3' Primer reverse 5'-AGCTGCCCCCTCAGCTTGA-3'
RPL13	Foward – 5' CCGCTCTGGACCGTCTCAA 3' Reverse – 5' CCTGGTACTTCCAGCCAACCT 3'

3.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS.

Os dados referentes à topografia superficial e adesão celular foram avaliados qualitativamente e apresentados de forma descritiva.

Os dados quantitativos referentes às avaliações de rugosidade superficial, viabilidade celular, síntese de colágeno, produção de proteína total e atividade de ALP foram submetidos à análise de distribuição e homogeneidade (teste Levene) e posteriormente analisados por meio dos testes estatísticos de ANOVA a um critério e Tukey.

Os dados referentes à avaliação de expressão genica foram analisados por meio dos testes de ANOVA a dois critérios, seguido do pós-teste de Tukey.

Todas as inferências estatísticas foram realizadas considerando o nível de significância de 5%.

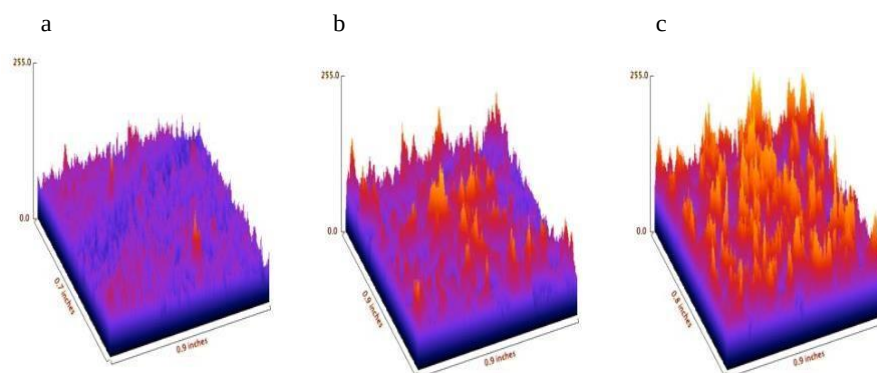
4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE SUPERFICIAL.

A análise da topografia superficial dos discos polidos e submetidos ao tratamento hidrotérmico alcalino com NaOH em diferentes temperaturas demonstrou que maiores irregularidades (picos e vales) foram observadas para os grupos tratados, especialmente para os discos submetidos a imersão a 120°C (Figura 12).

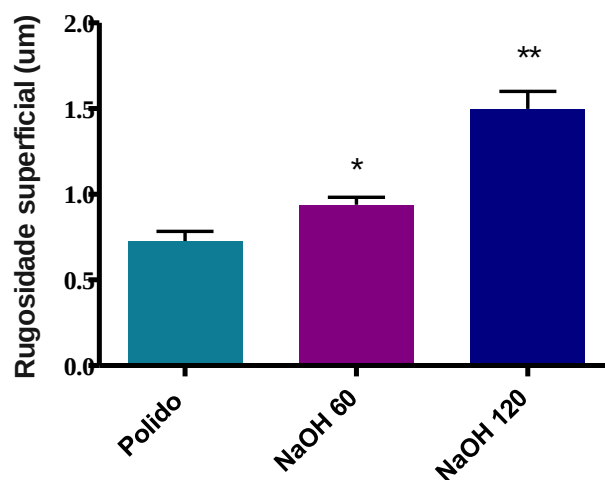
A análise quantitativa da rugosidade superficial corroborou esta análise, de forma que os discos de titânio submetidos ao tratamento em solução de NaOH a 120°C apresentaram os maiores valores de rugosidade, seguidos dos discos tratados a 60°C e dos discos polidos ($p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 12. Topografia das superfícies de discos polidos (a) e submetidos ao tratamento alcalino a 60 (b) ou 120°C (c).



Fonte: autor

Figura 13. Rugosidade superficial dos discos de titânio polidos e submetidos ao tratamento alcalino a 60°C ou 120°C. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes são estatisticamente diferentes entre si (Tukey, $p < 0,05$).

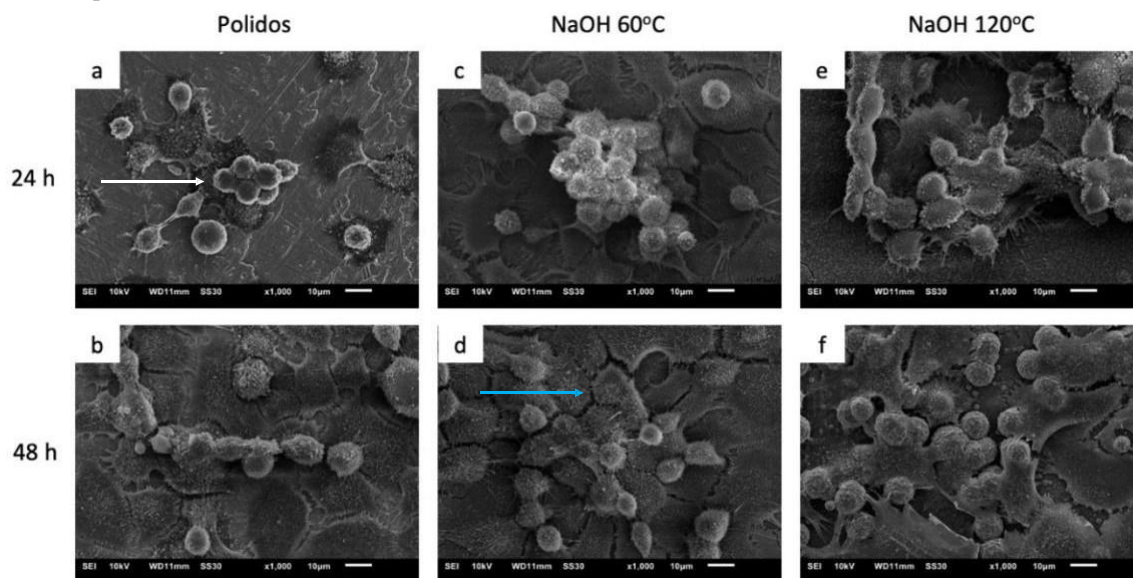


Fonte: autor

4.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR.

A análise da morfologia celular por meio de MEV demonstrou um maior número de células aderidas às superfícies tratadas com solução de NaOH, sem diferença entre as mesmas. Em 48 h, também é possível notar maior espreadimento dos osteoblastos sobre estas superfícies (Figura 14).

Figura 14. Morfologia dos osteoblastos aderidos às superfícies dos discos de titânio polidos e submetidos ao tratamento alcalino a 60°C ou 120°C, por meio de MEV, após 24 e 48 h do cultivo celular. A seta branca demonstra células arredondadas, com fraca adesão ao substrato, enquanto a seta azul demonstra células com alto espreadimento sobre o disco.



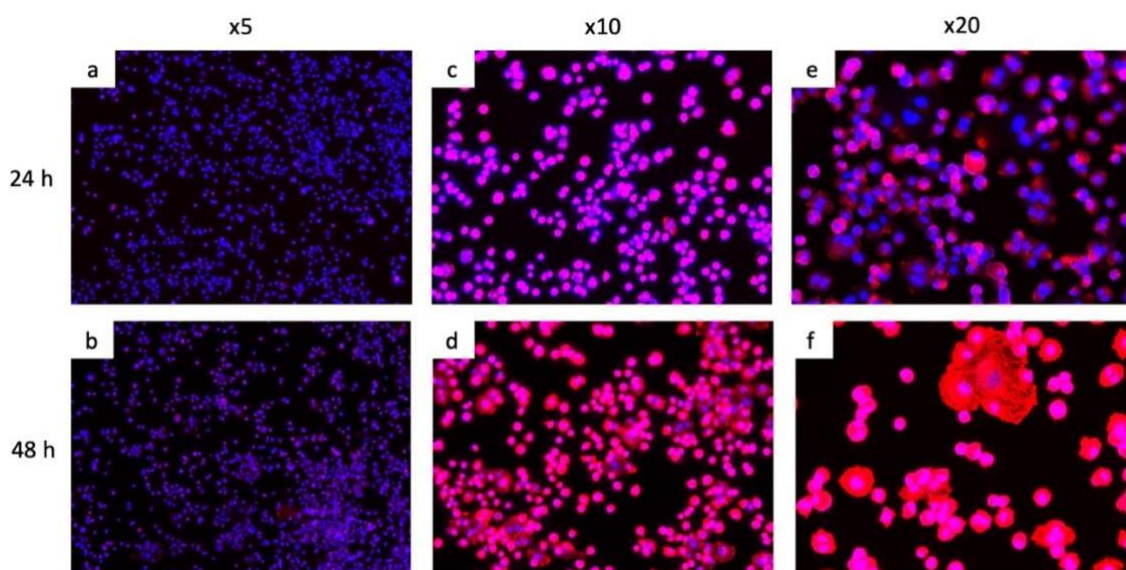
Fonte: autor

4.3 ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR.

A análise da adesão celular por microscopia de fluorescência demonstrou maior número de células aderidas às superfícies de titânio submetidas à modificação de superfície para ambos os períodos, sem diferença entre os protocolos.

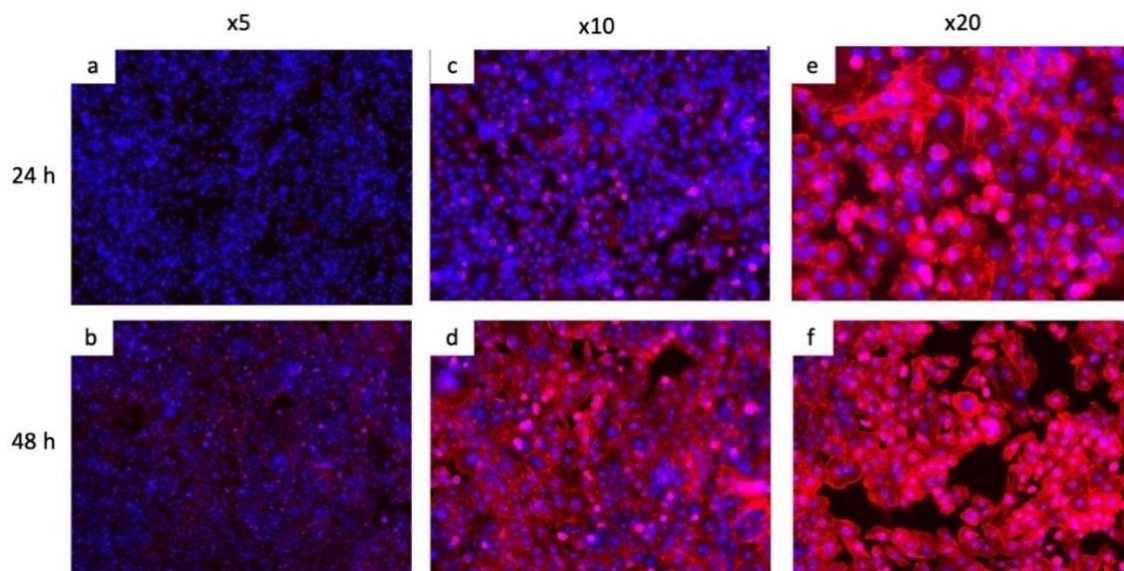
No período de 48 h foi possível observar também um maior espreadimento das células sobre tais superfícies quando comparadas à superfície de titânio polida, conforme evidenciado pela marcação dos filamentos de actina do citoesqueleto celular (em vermelho) (Figuras 15-17).

Figura 15. Morfologia dos osteoblastos aderidos às superfícies dos discos de titânio polidos, por meio de microscopia de fluorescência, após 24 (a,c,e) e 48 h (b,d,f) do cultivo celular. Em azul, é possível identificar o núcleo das células aderidas, enquanto os filamentos de actina do citoesqueleto estão corados em vermelho.



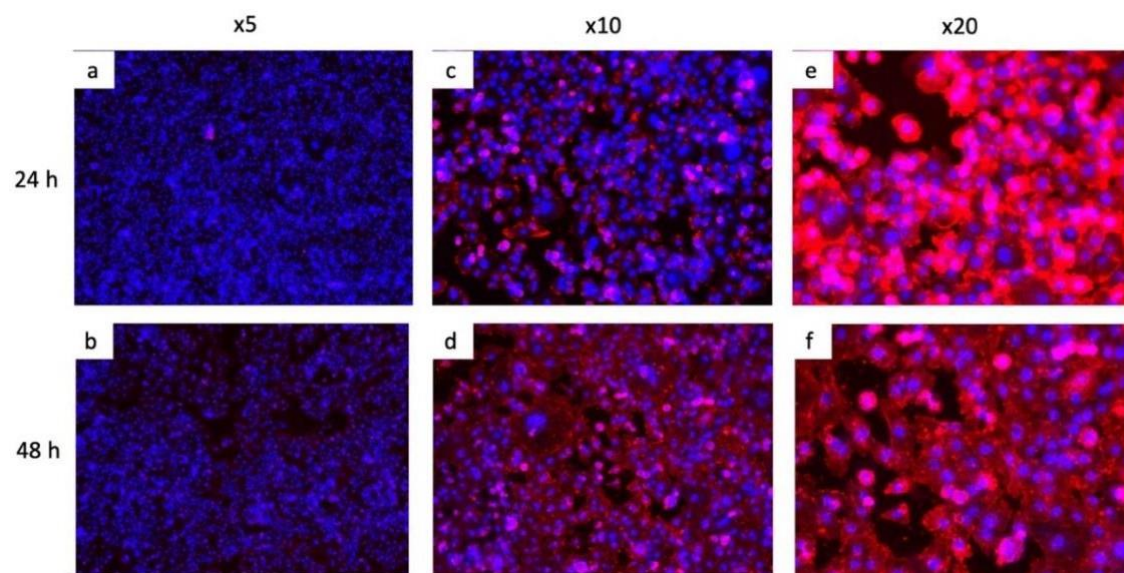
Fonte: autor

Figura 16. Morfologia dos osteoblastos aderidos às superfícies dos discos de titânio submetidos ao tratamento alcalino a 60°C, por meio de microscopia de fluorescência, após 24 (a,c,e) e 48 h (b,d,f) do cultivo celular. Em azul, é possível identificar o núcleo das células aderidas, enquanto os filamentos de actina do citoesqueleto estão corados em vermelho.



Fonte: autor

Figura 17. Morfologia dos osteoblastos aderidos às superfícies dos discos de titânio e submetidos ao tratamento alcalino a 120°C, por meio de microscopia de fluorescência, , após 24 (a,c,e) e 48 h (b,d,f) do cultivo celular. Em azul, é possível identificar o núcleo das células aderidas, enquanto os filamentos de actina do citoesqueleto estão corados em vermelho.

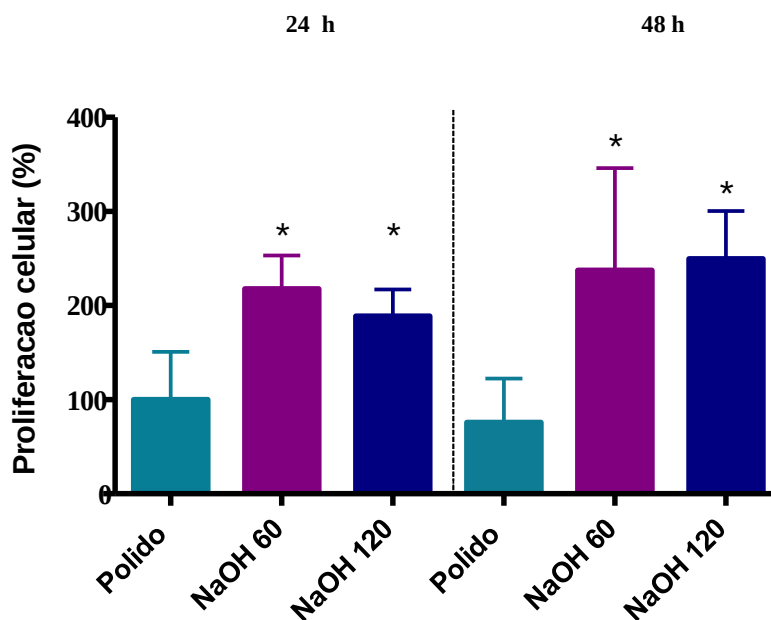


Fonte: autor

4.4 VIABILIDADE CELULAR.

Os osteoblastos cultivados sobre as superfícies tratadas apresentaram maior viabilidade celular quando comparados às estas células cultivadas sobre os discos de titânio polidos, para ambos os períodos de análise (24 e 48 h), sem diferença entre os protocolos de tratamento (Figura 18).

Figura 18. Viabilidade dos osteoblastos cultivados sobre os discos de titânio polidos e submetidos ao tratamento alcalino a 60°C ou 120°C., após 24 h e 48 h. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos indicam diferença estatisticamente significativa (n=6; Tukey, $p<0,05$).

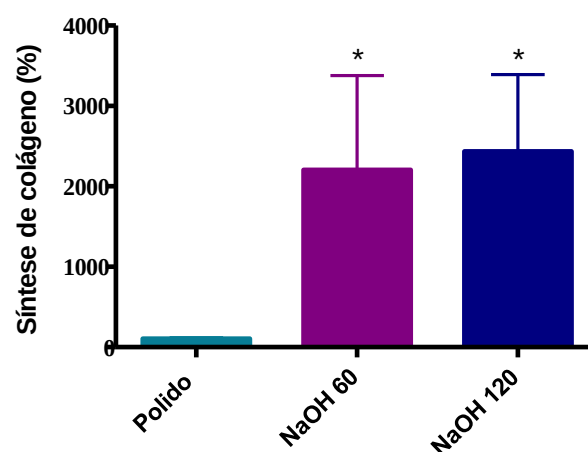


Fonte: autor

4.5 SÍNTESE DE COLÁGENO.

A síntese de colágeno foi significativamente maior para os osteoblastos cultivados sobre as superfícies de titânio tratadas com NaOH por 24 h a 60°C ou 120°C, sem diferença entre os protocolos (Figura 19).

Figura 19. Síntese de colágeno por osteoblastos cultivados sobre os discos de titânio polidos e submetidos ao tratamento alcalino a 60°C ou 120°C., após 7 dias. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (n=6; Tukey, $p<0,05$)

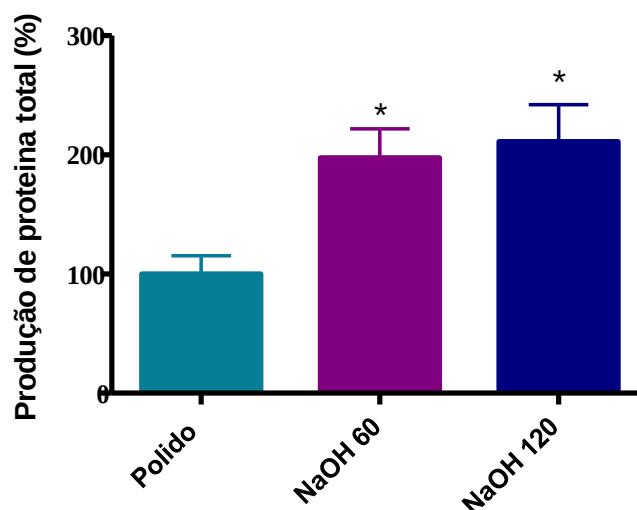


Fonte: autor

4.6 PRODUÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.

A produção de proteína total foi semelhante para os grupos experimentais nos quais os osteoblastos foram cultivados sobre as superfícies tratadas, sem diferença entre os protocolos. Tal produção foi significativamente maior do que comparada ao grupo de discos polidos (Figura 20).

Figura 20. Síntese de proteína total por osteoblastos cultivados sobre os discos de titânio polidos e submetidos ao tratamento alcalino a 60°C ou 120°C., após 7 dias. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

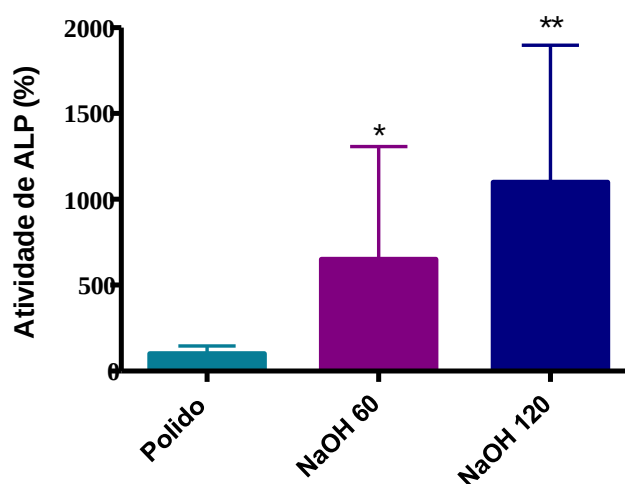


Fonte: autor

4.7 ATIVIDADE DE ALP.

A atividade de ALP foi significativamente maior para os osteoblastos cultivados sobre as superfícies tratadas, sendo que o tratamento a 120°C resultou nos maiores valores de atividade, seguido do protocolo a 60°C (Figura 21).

Figura 21. Atividade de ALP por osteoblastos cultivados sobre os discos de titânio polidos e submetidos ao tratamento alcalino a 60°C ou 120°C., após 7 dias. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).



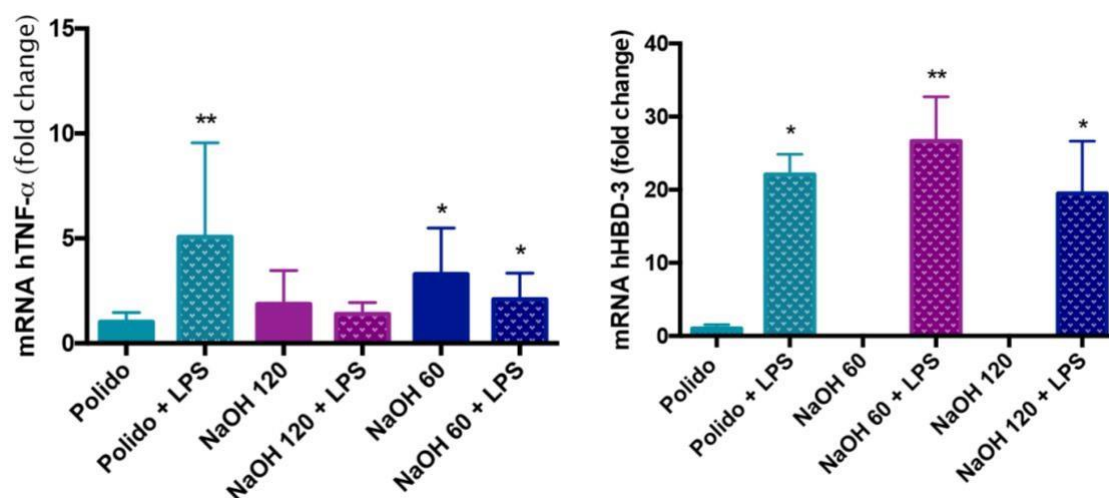
Fonte: autor

4.8 EXPRESSÃO GÊNICA.

A análise da resposta dos osteoblastos frente a exposição ao LPS quando cultivados sobre as diferentes superfícies demonstrou um aumento da expressão genica de TNF-alfa por estas células quando cultivadas sobre os discos polidos. Para os discos tratados com NaOH, não houve diferença entre os grupos expostos ou não ao LPS.

Quanto à expressão de HBD3, todos os grupos apresentaram aumento desta expressão na presença do LPS, sendo esta expressão mais evidente para o grupo de discos submetidos ao tratamento com NaOH a 60°C. (Figura 22)

Figura 22. Expressão gênica de TNF-alfa e HBD-3 por osteoblastos cultivados sobre os discos de titânio polidos e submetidos ao tratamento alcalino a 60°C ou 120°C., após 7 dias. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).



Fonte: autor

5. DISCUSSÃO

Sabe-se que a adesão dos osteoblastos aos implantes e, conseqüentemente, o processo de osseointegração, podem ser melhorados e acelerados por meio do aumento da rugosidade da superfície destes implantes (TRENTO *et al.*, 2020). Diversos métodos de modificação podem ser aplicados para que se obtenha uma superfície mais rugosa, no entanto, a alcalinização tem se mostrado bastante promissora, por associar este efeito a outros, como efeito antimicrobiano e formação de uma camada superficial que facilita o carregamento de moléculas orgânicas (ZENG *et al.*, 2019).

Este estudo avaliou o efeito da alcalinização de superfícies de titânio com hidróxido de sódio sobre osteoblastos humanos, utilizando um modelo de implantodontia *in vitro*, que simula a interação das células do tecido ósseo com as superfícies de implantes, por meio do cultivo direto destas células sobre discos de titânio previamente padronizados, de acordo com cada grupo experimental (BASSO *et al.*, 2020; BASSO *et al.*, 2021; PANSANI *et al.*, 2021).

Previamente às análises sobre o comportamento dos osteoblastos, as amostras foram submetidas a uma caracterização morfológica. Os resultados demonstraram um aumento da topografia e rugosidade superficiais a partir de ambos os protocolos de alcalinização, porém, mais evidente para maiores temperaturas (120°C), assim como previamente demonstrado (KIM *et al.*, 2013).

A análise da topografia superficial dos discos submetidos ao tratamento térmico alcalino com NaOH em diferentes temperaturas demonstrou que maiores irregularidades (picos e vales) foram observadas sem relação às polidas, especialmente para os discos submetidos a imersão a 120°C. A análise quantitativa da rugosidade superficial corroborou esta análise, de forma que os discos de titânio submetidos ao tratamento em solução de NaOH a 120°C apresentaram os maiores valores de rugosidade, seguidos dos

discos tratados a 60°C e dos discos polidos ($p < 0,05$), o que podendo facilitar o rápido acúmulo ósseo e, portanto, promover a adsorção de proteínas, adesão e proliferação celular, expressão gênica de mediadores inflamatórios por osteoblastos cultivados sobre as diferentes superfícies e expostos ao estímulo inflamatório, obtendo melhor a integração de tecidos.

Quanto à adesão dos osteoblastos, ambos os protocolos de alcalinização foram positivos na indução da adesão celular às superfícies de titânio, que demonstraram maior número de células aderidas, bem como maior espreadimento destas células quando comparados aos discos polidos. Este efeito pode ser justificado tanto pelo aumento da rugosidade, o que comprovadamente melhora a interação de células mesenquimais, como também pela biomodificação causada pelo processo de alcalinização, o que facilita a atração e a interação de moléculas orgânicas, como fatores de crescimento, também auxiliando na adesão de diferentes tipos celulares (CAI *et al.*, 2006; ENGEL *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2019).

De forma semelhante, o metabolismo dos osteoblastos também foi positivamente afetado pelos protocolos de alcalinização, demonstrado pelo aumento da viabilidade, síntese de proteína total e colágeno e atividade de ALP. Tais processos estão diretamente relacionados com o processo de reparo peri-implantar, que é determinado pela adesão de células osteoblásticas e pela deposição de matriz colágena e mineralização desta matriz (LOTZ *et al.*, 2018).

De forma geral, o metabolismo dos osteoblastos foi estimulado de forma semelhante para ambos os protocolos de alcalinização. No entanto, a atividade de ALP foi significativamente maior para as células cultivadas em discos tratados com NaOH a 120°C, o que deve ser resultado da maior irregularidade topográfica (rugosidade)

(PANSANI *et al.*, 2021). Assim, este protocolo, quando aplicado de forma isolada, parece ser mais promissor na aceleração da mineralização tecidual e também pode ser mais vantajoso do ponto de vista mecânico.

A modificação da superfície de implantes em escala micrométrica pode melhorar o contato entre o osso e implante e assim, alcançar melhorias biomecânicas e compatibilidade o que fornece um ambiente propício para acesso da osteogênese de contato e sinalização para as interações tecido-implante. A modificação da superfície e a presença de características em nanoescala na superfície dos implantes podem estimular a proliferação de células osteoblasticas. A razão por trás disso é a similaridade de características nanométricas com o ambiente biológico dos osteoblastos (CAI *et al.*, 2006; ENGEL *et al.*, 2008).

Atualmente, sabe-se que as características físicas e químicas da superfície do implante são essenciais fatores que afetam a taxa e extensão da osseointegração (BUSER, *et al.*, 2004; LANG *et al.*, 2011). Em termos de superfície físicas específicas, estudos recentes destacaram que o titânio nanoestruturado pode ter melhor osseointegração do que titânio com modificações de superfície em microescala porque superfícies em nanoescala têm uma área de superfície maior e podem simular melhor a matriz extracelular para facilitar o rápido acúmulo ósseo e, portanto, promove a adsorção de proteínas, adesão e proliferação celular, regulação gênica, e integração de tecidos (CAI *et al.*, 2006; ENGEL *et al.*, 2008;).

Apesar da grande quantidade de dados na literatura demonstrando os efeitos positivos da indução do aumento da rugosidade superficial dos implantes no processo de osseointegração, existem diversos protocolos que podem ser aplicados para que esta alteração de topografia e rugosidade seja alcançada (SHIBLI *et al.*, 2019; TRENTO *et al.*, 2020). Os tratamentos de subtração por ataque ácido foram precursores na

modificação de superfícies de titânio (LARSSON *et al.*, 1996), que resultaram na obtenção de superfícies com alta porosidade, no entanto, estes tratamentos também necessitam no emprego de ácidos fortes, gerando reações exotérmicas, e podem gerar compostos residuais (CHRCANOVIC *et al.*, 2013). Em contrapartida, a modificação de superfícies de titânio por alcalinização com NaOH se mostra mais efetiva e promissora, por não resultar em resíduos e riscos, além de facilitar o carreamento de moléculas que poderiam acelerar o processo de reparo peri-implantar (CAI *et al.*, 2006; ENGLE *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2019).

Dentre estas moléculas biologicamente ativas, podemos citar agentes estimuladores das células ósseas, fatores de crescimento, como proteínas morfogenéticas ósseas, a fim de para melhorar o processo de cicatrização óssea localmente (BESSHO *et al.*, 1999; LIU, 2005).

No que se refere à capacidade de resposta frente ao estímulo com LPS, as células cultivadas sobre os discos alcalinizados apresentaram menor síntese de TNF-alfa quando comparadas àquelas semeadas sobre os discos polidos. Este resultado, analisado isoladamente, pode ser interpretado de duas formas: à primeira vista, pode favorecer o reparo tecidual, reduzindo a ativação de enzimas proteolíticas e acelerando a fase proliferativa; ou ainda pode reduzir a capacidade de resposta frente à colonização bacteriana. No entanto, no presente estudo também foi avaliada a expressão gênica da enzima HBD-3, que atua na resposta imune inata em resposta a diferentes patógenos (CUI *et al.*, 2017), demonstrando que as células cultivadas sobre as superfícies alcalinizadas apresentaram maior ativação da expressão de HBD-3 na presença do LPS de *P.gingivalis*.

Apesar dos resultados positivos observados no presente estudo, devemos considerar os fatores de limitação do estudo, já que trata-se de um estudo em cultura de

células, e, portanto, tais resultados devem ser considerados de forma cautelosa, considerando o delineamento aplicado no estudo.

6. CONCLUSÕES

Os protocolos de alcalinização com NaOH (5M) a 60°C e 120°C resultaram em aumento significativo da topografia e rugosidade superficial das amostras;

Os osteoblastos cultivados sobre os discos submetidos à modificação superficial por meio de alcalinização com NaOH (5M) a 60°C e 120°C apresentaram maior viabilidade, síntese de proteína total e colágeno, bem como atividade de ALP quando comparados às células cultivadas sobre os discos polidos.

A expressão gênica de mediadores inflamatórios por osteoblastos foi influenciada pelos protocolos de alcalinização com NaOH (5M) a 60°C e 120°C, sendo a expressão de TNF reduzida para tais protocolos após exposição ao estímulo inflamatório com lipopolissacarídeos (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* (1µg/mL) por 4 h.

REFERÊNCIAS

ALLA, R.K.; GINJUPALLI, K.; UPADHYA N.; MOHAMED, S.; SEKAR, R.C.; RAVI, R.K. Surface roughness of implants: a review. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 25, n. 3, p. 112-118, jul. 2011.

ANSAR, E. B.; RAVIKUMAR, K.; BABU, S.S.; FERNANDEZ, F.B.; KOMATH M.; BASU, B.; VARMA, P.R.H. Inducing apatite pre-layer on titanium surface through hydrothermal processing for osseointegration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, p. 110-019, jul. 2019.

AHILA, S. C.; SUGANYA S.; MUTHUKUMAR B. Critical analysis of classification system of partially edentulous spaces: A literature review. *Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry*, v. 9, n. 1, p. 49, oct. 2019.

BASSO, F.G.; PANSANI, T.N.; CARDOSO, L.M.; CITTA, M.; SOARES, D.G.; SCHEFFEL, D.S.; HEBLING J.; DE SOUZA COSTA, C.A. Epithelial cell-enhanced metabolism by low-level laser therapy and epidermal growth factor. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 2, p. 445-449, mar. 2018.

BASSO, F.G.; PANSANI, T.N.; CARDOSO, L.M.; HEBLING, J.; REAL, R.P.V.; COSTA, C.A.S. Influence of bisphosphonates on the behavior of osteoblasts seeded onto titanium discs. **Brazilian Dental Journal**., v. 31, p. 304-309, jul. 2020.

BASSO, F.G.; CARDOSO, L.M.; RIBEIRO, I.M.; RIZZI E, PANSANI, T.N.; HEBLING, J.; DE SOUZA, COSTA, C.A. Influence of bisphosphonates on oral implantology: sodium alendronate and zoledronic acid enhance the synthesis and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts seeded on titanium. **Archives of Oral Biology**., v. 127, p. 105134, apr. 2021.

BESSHO, K.; CARNES, DL.; CAVIN, R.; CHEN, HY.; ONG, JL. BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. **Clin Oral Implants Research**., v. 10, n. 3, pag. 212-218, jun. 1999.

BUSER, D.; BROGGINI, N.; WIELAND, M.; SCHENK, R.K.; DENZER, A.J.; COCHRAN, D.L.; HOFFMANN, B.; LUSSI, A.; STEINEMANN, S.G. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. **Journal of Dentistry**., v. 83, n. 7, pag. 529-533, jul.2004.

CAI, K.; BOSSERT, J.; JANDT, K.D. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation Coll. **Surface Biology and Biointerphases**, v. 49, n. 2, pag. 136-144, may 2006.

CARDOSO, L.M.; PANSANI, T.N.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A.; BASSO, F.G. Photobiomodulation of inflammatory-cytokine,related effects in a 3-D culture model with gingival fibroblasts. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 5, pag. 1205 – 1212, jul 2020.

CAMARGO, W.A.; TAKEMOTO, S.; HOEKSTRA, J.W.; LEEUWENBURGH, S.C.G.; JANSEN, J.A.; VAN DEN BEUCKEN, J.J.P.; 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, pag. 511-523, jul.2017.

CARAMÊS, J.; MARQUES D.; BARBOSA J.M.; MOREIRA A.; CRISPIM, P.; CHEN A. Full-arch implant-supported rehabilitations: A prospective study comparing porcelain-veneered zirconia frameworks to monolithic zirconia. **Clinical Oral Implants Research**, v. 30, n. 1, pag. 68-78, jan 2019.

CHRCANOVIC, B.R.; LEÃO, N.L.C.; MARTINS, M.D. Influence of diferente acid etchings on the superficial characteristics of Ti sandblasted with Al₂O₃. **Materials Research**, v.16, n.5, p. 1006 – 1014, 2013.

COOPER, L.F. The current and future treatment of edentulism. *Journal of Prosthodontics: Implant, Esthetic and Reconstructive Dentistry*, v. 18, n. 2, pag. 116-122, feb. 2009.

CLAUDY, M.P.; MIGUENS JR, S.A.Q.; CELESTE, R.K.; PARENTE, R.C.; HERNANDEZ, P.A.G.; SILVA JR, A.N. Time interval after radiotherapy and dental implant failure: systematic review of observational studies and meta-analysis. **Clinical implant dentistry and related research**, v. 17, n. 2, pag. 402-411, apr. 2015.

CUI, D.; LYU, J.; LI, L.; LEI, L.; BIAN, TB.; Li, L.; YAN, F. Human B-defensin 3 inhibits periodontitis development by suppressing inflammatory response in macrophages. **Mol Immunol.**, v. 91, pag. 65-74, nov. 2017.

DEGASNE, I.; BASLÉ, M.F.; DEMAIS, V.; HURÉ, G.; GROLLEAU B.; MERCIER, L.; CHAPPARD, D. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. **Calcified tissue international**, v. 64, n. 6, pag. 499-507, jun. 1999.

ENGEL, E.; MICHIARD, A.; NAVARRO, M.; LACROIX, D.; PLANELL, J. A. Nanotechnology in regenerative medicine: The materials side. **Trends Biotechnol.**, v. 26, n. 1, pag. 39-47, jan. 2008.

FLAMANT, Q.; CARAVACA, C.; MEILLE, S.; GREMILLARD, L.; CHEVALIER, J.; BIOTTEAU-DEHEUVELS, K.; KUNTZ, M.; CHANDRAWATI, R.; HERRMANN, I.K.; SPICER, C.D.; STEVENS, M.M.; ANGLADA, M. Selective etching of injection molded zirconia-toughened alumina: Towards osseointegrated and antibacterial ceramic implants. **Acta biomaterialia**, v. 46, pag. 308-322, sep. 2016.

GERZSON, A.S.; PERES, C.A.; ROSA, M.B.; FETTER, E.P.; MARCHIONI, L.A. Surfaces in Implantology: Characteristics of the main Brazilian implants. **Dental Press Implantology**, v. 7, n. 4, oct./dec.2013.

INSUA, A.; MONJE, A.; WANG, H.; MIRON, R.J. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 105, n. 7, pag. 2075-2089, mar. 2017.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. Simulated body fluid (SBF) as a standard tool to test the bioactivity of implants. Handbook of biomineralization: **Biological aspects and structure formation**, pag. 97-109, may. 2007.

LAFABRIE, G.I.; SABOGAL, M.A.; CASTILLO, D.M.; RICÓN, M.V.; GÓMEZ, L.A.; LESMES, Y.A.; CHAMBRONE, L. Microbiome and microbial biofilm profiles of peri-implantitis: a systematic review. **Journal of Periodontology**, v. 88, n. 10, pag. 1066 – 1089, oct 2017.

LARSSON, C. THOMSEN, P.; ARONSSON, B.O.; RODAHL, M.; LAUSMAA, J.; KASEMO, B.; ERCSON, 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, pag. 605-616, mar. 1996.

LANG, N.P.; SALVI, G.E.; HUYNH-BA, G.; IVANOVSKI, S.; DONOS, N.; BOSSHARDT, D.D. EARLY. Osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. **Clinical Oral Implants.**, v. 22, n. 4, pag. 349-356, apr 2011.

LEE, H.J.; LEE, J.; LEE, J.T.; HONGS, JS.; LIM, B.S.; PARK, H.J. Microgrooves on titanium surface affect peri-implant cell adhesion and soft tissue sealing; an in vitro and in vivo study. **Journal of Periodontal Implant.**, v. 45, n. 3, pag. 120-126, jun. 2015.

LEITE, M.L.A.E.S.; SOARES, D.G.; BASSO F.G.; HEBLING, J.; COSTA, C.A.S. Biostimulatory effects of simvastatin on MDPC-23 odontoblast-like cells. **Brazilian Oral Research**, v. 18, pag. e104.

LIDDELL, R.; AJAMI, E.; LI, Y.; BAJENOVA, E.; YANG, Y.; DAVIES, J.E. The influence of implant design on the kinetics of osseointegration and bone anchorage homeostasis. **Acta Biomaterialia**, v. 121, pag. 514-526, nov. 2021.

LIU, Y.; DE, GROOT, K.; HUNZIKER, E.B. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. **Bone**, v. 36, n. 5, pag. 745-757, may. 2005.

LOTZ, E. M.; BERGER, M.B.; SCHWATZ.; BOYAN, B.D. Regulation of osteoclasts by osteoblast lineage cells depends on titanium implant surface properties. **Acta Biomaterialia**, v. 68, pag. 296-307, mar. 2018.

MAVROGENIS, A. F.; PARVIZI, J.; BABIS, G.C. Biology of implant osseointegration. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 9, n. 2, p. 61-71, apr./jun. 2009.

MARISCAL,-MUÑOZ.; E.; COSTA, C.A.S.; TAVARES, H.W.; BIANCHI, J.; HEBLING, J.; MACHADO, J.P.B.; LERNER, U.H.; SOUZA, P.C.C. Osteoblast differentiation is enhanced by nano-to-microhybrid titanium surface created by Yb-YAG laser irradiation. **Clinical Oral Investigations**, v.20, n.3, pag. 503-511, jul 2016.

MIAO, Y.; HARP, J.; MO, K.; ZHU, S.; YAO, T.; LIAN J.; YACOUT, A.M. Bubble morphology in U3Si2 implanted by high-energy Xe ions at 300 C. **Journal of Nuclear Materials**, v. 495, p. 146-153, nov. 2017.

NOCITI, J.R.; F.H.; TOLEDO, R.C.; MACHADO, M.A.N.; STEFANI, C.M.; LINE, S.R.P.; GONÇALVES, R.B. Clinical and micro-biological evaluation of ligature-induced periodontitis in dogs. **Clinical Oral Implants**, v. 12, n. 4, p. 295-300, aug. 2001.

NUNES, M.; ALMEIDA, R.F.; FELINO, A.C.; MALO, P.; NOBER, M.A. The Influence of Crown-to-Implant Ratio on Short Implant Marginal Bone Loss. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 31, n. 5, sep./oct. 2016.

PANSANI, T.N.; CARDOSO, L.M.; AUGUSTO, L.A.; RIBEIRO, I.M.; DE SOUZA COSTA, C.A.; BASSO, F.G. Effects of EGF-coated titanium surfaces on adhesion and

metabolism of bisphosphonates-treated human keratinocytes and gingival fibroblasts. **Clin Oral Investigations.**, v. 25, n. 10, pag. 5775-5784, apr. 2021.

PANSANI, T.N.; PHAN, T.; LEI, Q.; KONDYURIN, A.; KALIONIS, B.; CHRZANOWSKI W. Extracellular-vesicle-based coatings enhance bioactivity of titanium implants-surfEV. *Nanomaterials*, v. 11, n.11, pag. 1445, may 2021.

SIDDIQI, A.; PAYNE A.G.T.; DE SILVA, R.K.; DUNCAN, W.J. Titanium allergy: could it affect dental implant integration. **Clinical oral implants research**, v. 22, n. 7, p. 673-680, jan. 2011.

SHIBLI, J.A.; MARTINS, M.C.; LOTUFO, R.F.M.; MARCANTONIO, Jr. E. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants.**, v. 18, n. 3, may./jun. 2003.

SHIBLI, J.A.; MELO, L.; FERRARI, D.S; FIGUEIREDO, L.C.; FAVERI, M.; FERES, M. Composition of supra and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. **Clinical Oral Implants Res.**, v. 19, n. 10, pag. 975-982, oct. 2008.

SHIBLI, J.A.; FERRARI D.S.; SIROMA, R.S.; FIGUEIREDO L.C.; FAVERI M.; FERES M. Microbiological and clinical effects of adjunctive systemic metronidazole and amoxicillin in the non-surgical treatment of peri-implantitis: 1 year follow-up. **Brazilian Oral Research**, v. 33, pag. 1-5, 2019.

SCHWARZ, F.; SAHIN, D.; BECKER, K.; SADER, R.; BECKER, J. Autogenous tooth roots for lateral extraction socket augmentation and staged implant placement. A prospective observational study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 30, n. 5, p. 439-446, may. 2019.

KIM, D.; HUJA, S.S.; TEE, B.C.; LARSEN, PEP.; KENNEDY, K.S.; CHIEN H.; LEE, J.W.; WEN, H.B. Bone ingrowth and initial stability of titanium and porous tantalum dental implants: a pilot canine study. **Implant Dentistry**, v. 22, n. 4, p. 399-405, aug. 2013.

KULLAR, A. S.; MILLER, C. S. Are there contraindications for placing dental implants?. **Dental Clinics**, v. 63, n. 3, p. 345-362, jul. 2019.

TRENTO, G.; CARVALHO, P.H.A.; REIS, E.N.R.C.; SPIN-NETO, R.; BASSI, A.P. 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, feb. 2020.

ZAHARAN, R.; LEAL, J.I.R.; VALVERDE, MA.A.R.; VICHEZ, M.A.C. Effect of hydrofluoric acid etching time on titanium topography, chemistry, wettability, and cell adhesion. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0165296, nov.2016.

ZENG, X.; XIONG, S.; ZHUO, S.; LIU, C.; MIAO, J.; LIU, D.; WANG, H.; ZHANG, Y.; WANG, C.; LIU, Y. Nanosilver/poly (dl-lactic-co-glycolic acid) on titanium implant surfaces for the enhancement of antibacterial properties and osteoinductivity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 1849, mar. 2019.

ZITZMANN, N.U.; SCHÄRER, P.; MARINELLO, C.P. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 16, n. 3, may./jun. 2001.