

**Escola de Ciências
da Saúde**



Gabriela de Souza Castro

**BIOESTIMULAÇÃO DOSE-DEPENDENTE DA PRODUÇÃO DE MATRIZ MINERALIZADA
EM OSTEÓBLASTOS HUMANOS 2D E 3D EXPOSTOS AS PARTÍCULAS DE TiO_2
NANOESTRUTURADAS**

Duque de Caxias, RJ

2020

Gabriela de Souza Castro

**BIOESTIMULAÇÃO DOSE-DEPENDENTE DA PRODUÇÃO DE MATRIZ
MINERALIZADA EM OSTEÓBLASTOS HUMANOS 2D E 3D EXPOSTOS AS
PARTÍCULAS DE TiO₂ NANOESTRUTURADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Professor José de
Souza Herdy”, como parte dos requisitos
parciais para obtenção do grau de bacharel em
Odontologia.

Orientador(a): Sara Gemini Piperni

Duque de Caxias – RJ

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NUCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

C355b Castro, Gabriela de Souza.

Bioestimulação dose-dependente da produção de matriz mineralizada em osteoblastos humanos 2D e 3D expostos as partículas de TiO₂ nanoestruturadas / Gabriela de Souza Castro. – Duque de Caxias, 2020.
27 f. : il. ; 30 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em Odontologia) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2020.

“Orientadora: Prof.^a Sara Gemini Piperni”.

Referências: f. 22-27.

1. Odontologia. 2. Implantodontia. 3. Osteoblastos. 4. Dióxido de titânio. 5. Materiais nanoestruturados. I. Piperni, Sara Gemini. II. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. III. Título.

CDD – 617.6

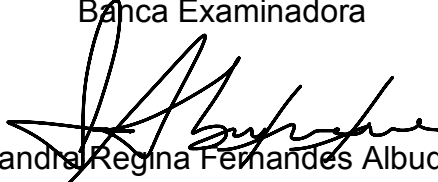
Gabriela de Souza Castro

**BIOESTIMULAÇÃO DOSE-DEPENDENTE DA PRODUÇÃO DE MATRIZ
MINERALIZADA EM OSTEÓBLASTOS HUMANOS 2D E 3D EXPOSTOS AS
PARTÍCULAS DE TiO_2 NANOESTRUTURADAS**

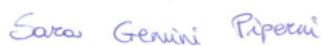
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade do Grande
Rio "Professor José de Souza Herdy",
como parte dos requisitos parciais para
obtenção do grau de bacharel em
Odontologia

Aprovado em 11 de dezembro de 2020.

Banca Examinadora


Prof. Sandra Regina Fernandes Albuquerque
Universidade do Grande Rio


Prof. Walter Arthur Valente
Universidade do Grande Rio


Prof. Drª Sara Gemini Piperni
Universidade do Grande Rio

AGRADECIMENTOS

Obrigada, Deus, por me manter forte, intuída e protegida diante dos desafios. Obrigada por colocar no meu caminho cada uma das pessoas abaixo.

Obrigada, meu pai Jorge Aloisio e minha mãe Maria Emilia, por não medirem esforços para que eu concluísse a minha formação, por enfrentarem todas as dificuldades para que eu chegasse até aqui, por me ensinarem com seus exemplos sobre valores, perseverança, garra, coragem e amor ao próximo.

Obrigada, meus irmãos Thiago e Diogo, por serem meus melhores amigos e companheiros, por cuidarem de mim, por serem presentes na minha vida e por fazerem tudo o que podiam, junto aos nossos pais, para manter meus estudos.

Obrigada, meus amigos Bruna Gontijo, João Marcos Rocha e Patrick Cruz, por tornarem esses 4 anos e meio de graduação mais leves, iluminados e felizes, por sempre me apoiarem, por serem combustível de bons sentimentos e por compartilharem comigo essa parte da minha história.

Obrigada, minha amiga e dupla Silvia Santos, por dividir o mocho e a vida comigo desde o primeiro período, por fazer das risadas a nossa rotina, por me trazer calma e confiança e por ser tão parceira desde as gambiarras nos laboratórios até os atendimentos nas clínicas. Enfim, chegamos juntas na tão esperada formatura.

Obrigada, meu namorado Lucas Fontam, por ser tão amigo e parceiro, por toda a ajuda e todo o cuidado nessa reta final da minha graduação, por sempre me incentivar como profissional, por ser minha soma na vida e por fazer desse momento ainda mais especial.

Obrigada, minha orientadora Sara Gemini Piperni, por ser minha inspiração, por sempre me apoiar não só na pesquisa, mas também na vida, por me encorajar a vencer minhas próprias barreiras, por me apresentar possibilidades incríveis e, principalmente, por acreditar e apostar em mim.

Obrigada, todos os profissionais que participaram do meu processo de formação, em especial minha coordenadora de curso Renata Pardini e meus professores Leila Chevitarese, Rogério Alves, Walter Arthur, Isabela Eustáquio e Wallace Casadio, por sempre me fazerem sentir capaz, por ratificar em mim o amor à Odontologia, por cada palavra de incentivo, pelas correções e pela honra de ter vocês como parte da minha vida acadêmica.

RESUMO

Nas últimas décadas, o desenvolvimento das nanociências e da nanotecnologia trouxe grande impacto na saúde humana respondendo ao aumento significativo da expectativa de vida somado à consciência mundial de prover melhor qualidade de vida às populações. Diante deste contexto, uma das áreas que espera um grande desenvolvimento nas próximas décadas é a de implante dentário. O dióxido de titânio e suas ligas são biomateriais usados extensivamente em implantes dentários e ortopédicos em razão da sua biocompatibilidade e osteointegração. Contudo, a literatura mostra que estes implantes são sujeitos a desgaste que, como resultados, promovem a liberação de partículas em micro e nanoescala. Apesar de inúmeros estudos terem sido desenvolvidos para avaliar os efeitos biológicos das partículas liberadas em escala macro e micro, ainda falta uma regulamentação específica para a avaliação dos efeitos das partículas em nanoescala, tanto da eventual citotoxicidade, quanto ao possível potencial bioestimulador. Diante disso, fazem-se necessários estudos comparativos de vários modelos para compreender melhor a interação deste tipo de materiais nanoestruturados com organismos vivos. Por isso, o objetivo principal deste projeto é comparar a diferenciação e produção de matriz mineralizada de osteoblastos humanos SAOS-2 em monocamada ou modelos celulares de esferóides 3D expostos a doses crescentes de TiO_2 anatase nanoestruturado.

Palavras-chave: Titânio, implantes, biomaterial, osteoblastos, tecido ósseo.

ABSTRACT

In the last decades, nanosciences and nanotechnology development significantly impacted human health, responding to the significant increase in life expectancy coupled with the worldwide awareness to provide better life quality to populations. One of the areas that expects great development in the next decades is dental implant. Titanium dioxide and its alloys have been used extensively in dental and orthopedic implants due to their biocompatibility and osteointegration. Literature shows that these implants are subject to wear and tear, which, as a result, promote the release of particles in micro and nanoscale. Although numerous studies have been developed to assess the biological effects of macro and micro particles, there is still a lack of specific regulations for the evaluation of the effects of nanostructured materials, both of possible cytotoxicity and of the possible biostimulatory potential. Consequently, comparative studies of several models are necessary to better understand the interaction of this type of nanostructured materials with living organisms. Therefore, the main objective of this project is to compare the differentiation and production of mineralized matrix of human osteoblasts SAOS-2 in monolayer or 3D spheroid cell models exposed to increasing doses of nanostructured TiO₂ anatase.

Keywords: Titanium, implants, biomaterial, osteoblasts, bone tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática do reticulado tetragonal do TiO ₂ fase anatase.	8
Figura 2 Análise do tamanho das nanopartículas por DLS.	15
Figura 3 Viabilidade de células SAOS2 2D e 3D.....	15
Figura 4. Produção de matriz mineralizada por células SAOS2 2D e 3D.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Propriedades gerais do titânio	6
---	---

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 Titânio	6
1.2 Tecido ósseo.....	8
1.3 Osteoblastos	10
1.4 Modelos 2D e 3D	11
2 JUSTIFICATIVA.....	12
3 OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo Geral	13
3.2 Objetivos Específicos	14
4 RESULTADOS.....	14
5 DISCUSSÃO	18
6 CONCLUSÃO	21
REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

1.1 Titânio

O titânio é o quarto metal mais abundante crosta terrestre com características peculiares. É um metal de transição tão forte quanto alguns aços, porém com a metade de sua densidade. Apresenta baixa densidade ($4,51 \text{ g/cm}^3$), elevado ponto fusão (1670°C), módulo de elasticidade (Young) de 115 GPa, resistência à tração de 740 Mpa e módulo de cisalhamento igual a 45 GPa (1).

Por ser um elemento de transição, apresenta na sua estrutura eletrônica a camada d incompleta, o que lhe possibilita formar soluções sólidas com a maioria dos elementos substitucionais (2, 3, 4). O elemento foi descoberto na Inglaterra em 1790, pelo químico William Gregor ao analisar uma amostra de areia da região do vale de Manaccan, na Cornualha, mas só teve seu nome escolhido em 1795, por Klaproth, em homenagem aos Titãs, os quais são mitologicamente conhecidos como sendo os primeiros filhos da Terra, conhecidos pela força física extraordinária (2).

Tabela 1 Propriedades gerais do titânio. (5, 6)

Propriedades do Titânio	
Massa atômica	47,867 u
Densidade	$4,51 \text{ g/cm}^3$
Ponto de fusão	1668°C
Resistência mecânica à tração	Alta, entre 200 e 1370 Mpa
Resistência à corrosão	Alta
Massa atômica	47,867 u
Condutividade térmica e elétrica	Baixa
Coeficiente de expansão térmica	$8,41 \times 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$
Módulo de elasticidade	107 GPa
Biocompatibilidade	Sim

O Titânio e suas ligas são comumente relatados como mais vantajosos para aplicações biomédicas em comparação aos demais biomateriais metálicos, porque apresentam propriedades mecânicas razoavelmente compatíveis com a função, bem como resistência à corrosão e desgaste e biocompatibilidade superiores (7).

Contudo, o titânio comercialmente puro tem como desvantagem a fraca resistência ao desgaste por uso, o que o torna inadequado para aplicações que exijam elevada tensão, como os implantes dentários, por exemplo. Por este motivo, o titânio tem sido utilizado como elemento base para a formação de ligas juntamente com

outros elementos químicos, como o alumínio, o vanádio e o ferro, que têm a finalidade de melhorar as forças de tensão (liga Ti-6Al-4V). Dessa forma, o titânio ganha características que o tornam um material superior quanto ao desgaste, anteriormente citado como um dos principais fatores para classificar um bom biomaterial, assim como a biocompatibilidade. O titânio, além das características físico-químicas supracitadas, apresenta reduzida rejeição com os tecidos que circundam o implante devido a passivação, que se dá pela formação do filme de dióxido de titânio (TiO_2), geralmente de espessura nanométrica, na superfície do metal. Este fator é de grande importância para uma possível osseointegração (8).

Um biomaterial, em sua definição mais aceita, é qualquer substância (ou combinação de substâncias) utilizada por determinado período de tempo como um todo ou parte de um sistema vivo para o tratamento ou substituição de qualquer tecido, órgão ou função deste organismo sem causar efeitos prejudiciais enquanto em contato íntimo com o mesmo (9).

Para que um material seja aplicado como um biomaterial em casos de substituição e regeneração óssea, alguns requisitos são fundamentais. Por exemplo, é desejável que o biomaterial seja: biofuncional, ou seja, que apresente propriedades mecânicas adequadas, especialmente resistência à fadiga e módulo de elasticidade (Young) tão próximo ao do osso quanto ($18,14 \pm 1,7$ GPa para o osso trabecular e $20,2 \pm 0,27$ GPa em osso cortical) (10); resistente à corrosão e à biotribocorrosão; biocompatível, ou seja, que não cause nenhum tipo de efeito nocivo ao corpo; osseointegrável, ou capaz de se ligar e promover crescimento e integração óssea.

Além disso, processabilidade e disponibilidade, são fatores importantes a se considerar (11). No uso odontológico, os resultados são satisfatórios, sendo mínima a porcentagem de perda de implantes dentários. Devido a estas necessidades e considerando a ampla gama de ligas de titânio disponíveis, os sistemas mais comumente aplicados na confecção de implantes biomédicos são o titânio comercialmente puro (Ti-cp), correspondente a 30% da produção total de titânio como biomaterial, e a liga Ti-6Al-4V, uma liga composta por 90% de titânio, 6% de alumínio e 4% de vanádio (% em peso), que corresponde a 45% do total desta produção (12). Neste contexto, tanto o titânio puro quanto as ligas Ti-6Al-4V são largamente utilizadas como implantes dentários, implantes para a reposição da articulação de quadril, joelho, ombro, cotovelo e punho, dispositivos para fixação óssea (parafusos), dentre outras (13).

Na sua composição química, o dióxido de titânio se apresenta na natureza sob três formas cristalinas: rutilo, anatase e broquita. A estrutura do TiO_2 anatase é tetragonal e está mostrada esquematicamente na Figura 1. (14) Dentre as fases polimórficas do TiO_2 , a mais ativa fotocataliticamente é a anatase. Alguns trabalhos mostram que essa melhor eficiência é devido a sua maior área superficial, maior tempo de vida dos elétrons fotoexcitados. (15, 16)

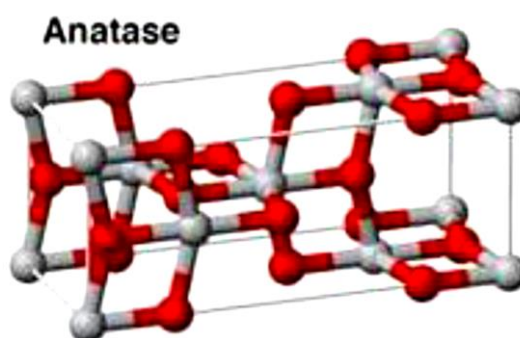


Figura 1 Representação esquemática do reticulado tetragonal do TiO_2 fase anatase.
Fonte: Adaptado de (14).

1.2 Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado dinâmico, que apesar da sua aparência inerte, está em constante remodelação (17) e exercendo funções importantes no corpo como, locomoção, suporte e proteção para tecidos moles e órgãos vitais, armazenamento de cálcio e fosfato e alojamento de medula óssea.

O osso exerce funções importantes no organismo, tais como: locomoção, suporte e proteção de outros tecidos e órgãos e ainda serve como meio para armazenar e estocar cálcio e fósforo (18, 19, 20). Assim como os demais tecidos conjuntivos, o tecido ósseo é formado por células e uma matriz extracelular, sendo esta última constituída por uma parte orgânica e uma inorgânica, extremamente importante para o metabolismo ósseo, além de conferir rigidez e resistência a impactos, o que é essencial para manter a integridade deste tecido (21).

Além disso, o tecido ósseo apresenta função endócrina, produzindo o hormônio osteocalcina. O osso também medeia audição, que é um meio de detectar o perigo. Uma finalidade similar no contexto de perigo pode ser atribuída a vários

processos fisiológicos intensificados pela osteocalcina. Estudos apontam que as funções clássicas e endócrinas de osso podem equipar vertebrados ósseos com uma ferramenta para a resposta de fuga. Se esta interpretação estiver, pelo menos em parte, correta, osso deve regular outras funções fisiológicas ativadas na presença de perigo (22).

A parte inorgânica do osso se apresenta na forma de sais minerais de hidroxiapatita fosfatada e carbonatada (23, 24), enquanto o colágeno é considerado o principal componente orgânico da matriz óssea (25). A matriz orgânica contém 90% de proteínas de colágeno, predominantemente de colágeno tipo I (que se organiza em estruturas fibrilares que tem origem na microfibrila) e proteínas não colágenas, incluindo osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina e osso sialoproteína II, proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e fatores de crescimento.

A parte mineral dos tecidos duros, tanto nos ossos como nos dentes, é composta pela forma cristalina do fosfato de cálcio similar à hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Este cristal possui estrutura frágil e sua resistência mecânica é pobre, mas sua associação com fibras colágenas confere ao tecido ósseo alto grau de rigidez e resistência à tensão mecânica.

A formação das microfibrilas partir é realizada partindo das interações das moléculas de tropocolágeno. Além de pequenas quantidades de outras proteínas, as ligações cruzadas de colágeno são responsáveis pela resistência à tração e elasticidade do tecido. A extensão e o tipo da ligação cruzada estão diretamente ligados com a idade e função do tecido. O aumento da tensão nas fibras de colágeno aumenta o número de ligações cruzadas para produzir as propriedades mecânicas ideais para dada função do organismo. Ligações estas que fornecem as propriedades viscoelásticas no tecido ósseo. associação com fibras colágenas confere ao tecido ósseo alto grau de rigidez e resistência à tensão mecânica. Também são encontradas quantidades significativas de bicarbonato, sódio, potássio, citrato, magnésio, carbonato, fluoreto, zinco, bário e estrôncio.

São quatro tipos de células do tecido ósseo: células osteoprogenitoras, osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. As osteoprogenitoras são células mesenquimais com capacidade de diferenciar-se e proliferar-se em células formadoras de tecido ósseo, osteoblastos. Os osteócitos são células que, através dos seus prolongamentos mantêm contato com os demais osteócitos e permitem a passagens de moléculas e íons, exercendo um papel fundamental em manter a

integridade da matriz óssea.. Os osteoblastos, tipo celular que será melhor abordado posteriormente, são células jovens com intensa atividade metabólica e responsáveis pela produção de tecido ósseo. Já os osteoclastos, são células muito grandes que resultam da fusão de várias células do sistema fagocitário mononuclear e agem na reabsorção óssea.

1.3 Osteoblastos

Os osteoblastos são células com formato cúbico ou cilíndrico e de aparência epitelial, formando uma monocamada que recobre todos os locais ativos de formação óssea. Células mesenquimais pluripotentes dão origem aos osteoblastos, que são responsáveis pela osteogênese, ou seja, pela síntese e secreção da matriz orgânica, além de armazenarem minerais e revestirem a maioria das superfícies ósseas. Os osteoblastos iniciam e controlam a mineralização subsequente do osteóide. Em eletromicrografias, os osteoblastos exibem as características típicas de células alivameme engajadas na síntese, glicosilação e secreção de proteínas. (26). Quando em atividade, os osteoblastos se hipertrofiam e o núcleo se desloca para a extremidade mais distante da superfície óssea. Conforme a matriz endurece, os osteoblastos amadurecem e tornam-se osteócitos (27).

As células osteoblásticas desempenham um papel importante na formação óssea, que é composta por um processo de três etapas: proliferação (aumento do número de pré-osteoblastos), diferenciação (processo pelo qual os pré-osteoblastos se tornam osteoblastos maduros) e mineralização da matriz (a formação de nova matriz óssea pelos osteoblastos maduros) (27).

A remodelação óssea começa com a ativação de osteoclastos, dando início a um processo de reabsorção. Em seguida, à medida que a reabsorção progride, novos precursores dos osteoclastos são recrutados. Quando as células osteoclásticas param de remover tecido ósseo, surgem os osteoblastos, que logo revertem o processo de reabsorção e iniciam a secreção de osteóide (porção orgânica de matriz não mineralizada). Os osteoblastos depositam tecido ósseo e, por fim, ficam aprisionados dentro da matriz mineralizada e transformam em osteócitos (27).

A qualidade do osso é um fator bastante relevante dentro da Odontologia de modo geral e em suas áreas de especialidades. O osso é a base de tecido duro que sustenta os dentes. Na Implantodontia, por exemplo, mandíbula e maxila recebem

diretamente em seu interior os parafusos de implante dentário. Busca-se saber cada vez mais como o nosso organismo, principalmente as células ósseas, reagem a esse contato osso e implante a nível estrutural e, como neste estudo, a nível nanométrico, através de nanopartículas de titânio. A produção de matriz óssea mineralizada em torno dos parafusos de implante é um processo indispensável para o sucesso do procedimento.

1.4 Modelos 2D e 3D

Por muito tempo as evidências *in vitro* para estudar mecanismos celulares e de doenças se basearam em culturas de células de duas dimensões (2D) cultivadas em uma placa de cultivo celular dentro de um ambiente artificial controlado. Na última década, no entanto, as culturas de células em três dimensões (3D) na forma de esferoides ou organoides tornaram-se cada vez mais populares por serem mais relevantes fisiologicamente e mimetizam melhor a complexidade do tecido *in vivo*.

Os modelos 2D, mesmo sendo modelos mais simples e econômicos, são cultivados em uma única camada plana (monocamada) sobre um substrato rígido e artificial onde as proteínas celulares induzem uma ligação, ou seja, adesão celular, com as proteínas do soro que encobrem esse substrato simulando a matriz extracelular presente *in vivo*. Por outro lado, a organização tecidual original se perde, além da polaridade e as interações entre proteínas acabam sendo limitadas. Integrinas e o citoesqueleto das células podem sofrer alterações, modificando sua morfologia inicial. Metabolismo, fenótipo e genótipo também apresentam comumente modificações em comparação aos modelos *in vivo*.

De fato, nenhum tipo de célula em nosso corpo cresce como uma monocamada independente de outras células ou tecidos, sendo a maioria das células existe naturalmente em estruturas 3D complexas, incluindo diferentes tipos de células dentro de uma matriz extracelular. As inúmeras interações célula-célula e matriz celular têm um efeito profundo em seu comportamento. Além disso, não se perde a polaridade celular, que é importante para a organização celular e sua funcionalidade. Nesses modelos, os receptores de superfície podem ligar-se às proteínas da matriz extracelular e por isso podem determinar sinais bioquímicos celulares, que serão interpretados pelas células levando a proliferação, invasão celular, diferenciação e apoptose.

Para superar estas limitações foi realizado o modelo de cultura de células 3D, uma forma de cultura que permite que as células se organizem e interajam com a estrutura extracelular circundante em três dimensões.

Além das diferenças na organização estrutural as monocamadas estes dois modelos tem diferente acesso a nutrientes e oxigênio, sendo que as células 2D tem um acesso mais homogêneo aos nutrientes e os 3D têm menos acesso a nutrientes e oxigênio em comparação com a camada externa, formando um gradiente natural representando de forma mais fiel tecidos de massas celulares, como tumores.

Culturas de células 3D podem ser cultivadas com ou sem um suporte estrutural. Os métodos de cultivo tridimensional sem a presença de suporte dependem das células para se autoagruparem. São alguns exemplos mais populares as placas de baixa adesão, onde as placas são revestidas com polímero hidrofílico para impedir que as células grudem na superfície, permitindo que as células se agrupem e formem sua própria matriz extracelular (ECM); superfícies com micropadrão, em que as superfícies de plástico são modificadas para fornecer um micropadrão ou micropoços que induzem as células a crescer como aglomerados; gota suspensa, onde as células são colocadas em uma gota suspensa de meio, permitindo que as estas se agreguem e formem esferóides no fundo da gota.

Alguns desses suportes estruturais são os hidrogéis, material polimérico contendo uma rede de cadeias poliméricas reticuladas que podem absorver e reter água, que podem ser de origem animal (Matrigel®, colágeno) ou vegetal (alginato, agarose) ou sintetizado a partir de produtos químicos (QGel® Matrix). Outras estruturas são as matrizes inertes, membranas semelhantes a esponjas feitas de poliestireno que contêm poros para as células proliferarem e crescerem. De maneira resumida, além de imitar melhor estruturas semelhantes a tecido, também é possível simular condições de microambiente, como hipóxia e gradientes de nutrientes, e é melhor de prever respostas *in vivo* ao tratamento medicamentoso. Diante disso, este projeto visa comparação do modelo 2D com modelo esferoidal 3D na produção de matriz óssea após a exposição às partículas de TiO₂ nanoestruturadas.

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a população idosa em 1970 correspondia a 4,95%, percentual que chegou a 11%, em 2010. Com o aumento da expectativa de vida, observa-se também mudança no perfil de saúde. A perda dental é um desfecho complexo que é

influenciado pela extensão de cárie dental e sua sequela e/ou presença de doença periodontal, e é observado predominantemente nos idosos. Na implantodontia, o setor vem recebendo cada vez mais investimento e a projeção é que, nos próximos anos, continuem aumentando. Isso responde ao aumento do número de perdas dentárias decorrentes das necessidades da população idosa que cresce em quase todo o mundo (28, 29).

Atualmente, os implantes são uma parte indispensável da odontologia clínica. O titânio é o biomaterial mais utilizado em parafusos de implantes dentários, área que está em ascensão. Segundo dados, a expectativa de crescimento do setor mundial passa de US\$ 3,2 bilhões em 2010 a US\$ 15,9 bilhões em 2025. Isso sem contar que apenas 3% da população sem dentes receberam implantes dentários. Dessa forma, temos 97% de desdentados precisando de procedimentos. Essa expansão responde ao aumento significativo da expectativa de vida somado à consciência mundial de prover melhor qualidade de vida às populações (30, 31).

A literatura mostra diversos estudos sobre a biocompatibilidade do titânio em escala de macro e micro partículas, sejam em forma de superfícies, ou os próprios parafusos de implante. Porém, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas quando se trata dos efeitos biológicos em escala nanométrica destas partículas. É de suma importância compreender o que acontece com as células ósseas diante da sua exposição direta ao titânio e durante o processo inevitável da degradação do titânio ao longo do tempo. Além disso, a maioria dos estudos já existentes trabalham com células em modelo 2D (monocamada), sendo que os modelos 3D (esferóides) mimetizam melhor os tecidos do corpo humano e trazem resultados mais fidedignos.

Esse ponto-chave abre caminhos para que sejam feitos mais estudos envolvendo nanopartículas em busca de mais resultados sobre a influência das nps sobre célula, como foi feito no presente estudo para que possa ser realizada evolução contínua dos tratamentos dentários modernos de implantes, a fim de melhorar e estimular ativamente a formação óssea.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho é comparar o potencial bioestimulador de osteoblastos humanos SAOS-2 em monocamada e em modelo celular esferoidal 3D após exposição à doses crescentes de TiO_2 anatase nanoestruturado.

3.2 Objetivos Específicos

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

4 RESULTADOS

4.1 Dispersão das partículas de TiO_2 .

Para confirmar o tamanho nanométrico da população de TiO_2 foi realizada uma dispersão mediante sonicação em meio aquoso com sonda direta e impulso alternado 8 segundos *on* e 2 segundos *off*. Após da dispersão análise de DLS confirmaram o tamanho médio da população de nanopartículas próximos de 100 nm antes e depois do contato com meio em presença de 0,1 mg/ml de BSA (Figura 2), confirmando os dados anteriores obtidos no grupo de pesquisa.

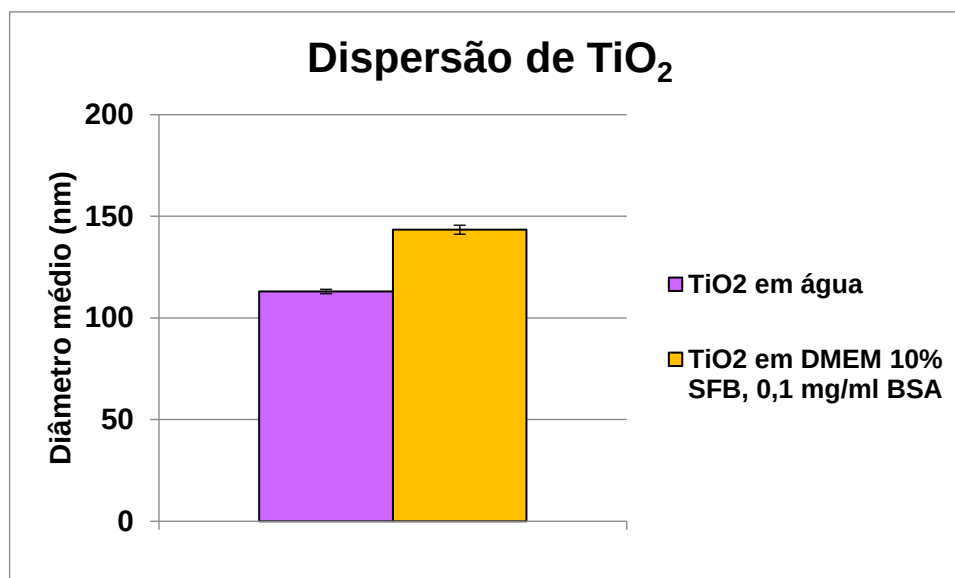


Figura 2 Análise do tamanho das nanopartículas por DLS. Após a dispersão por ultrassonicação, o tamanho das partículas foi medido por DLS em água e depois do contato com meio de cultivo confirmando o tamanho nanométrico das partículas. Os resultados são a média de três experimentos independentes

Após da exposição das células SAOS2 ao TiO₂ nanoestruturado (0-5-100 µg/ml) durante 3 e 21 dias (tempo necessário para mineralização) a viabilidade celular foi avaliada mediante a técnica de PI/Anexina por citometria de fluxo. Os resultados mostram ausência de citotoxicidade nos tempos de exposição indicados, tanto em modelo de monocamada 2D quanto em modelo esferoidal 3D (Figura 3).

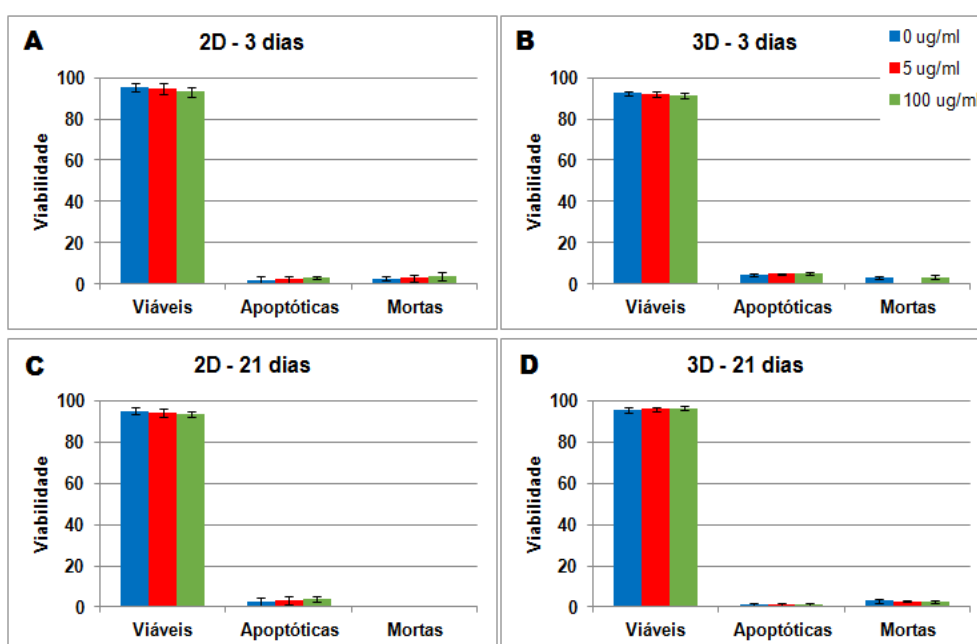
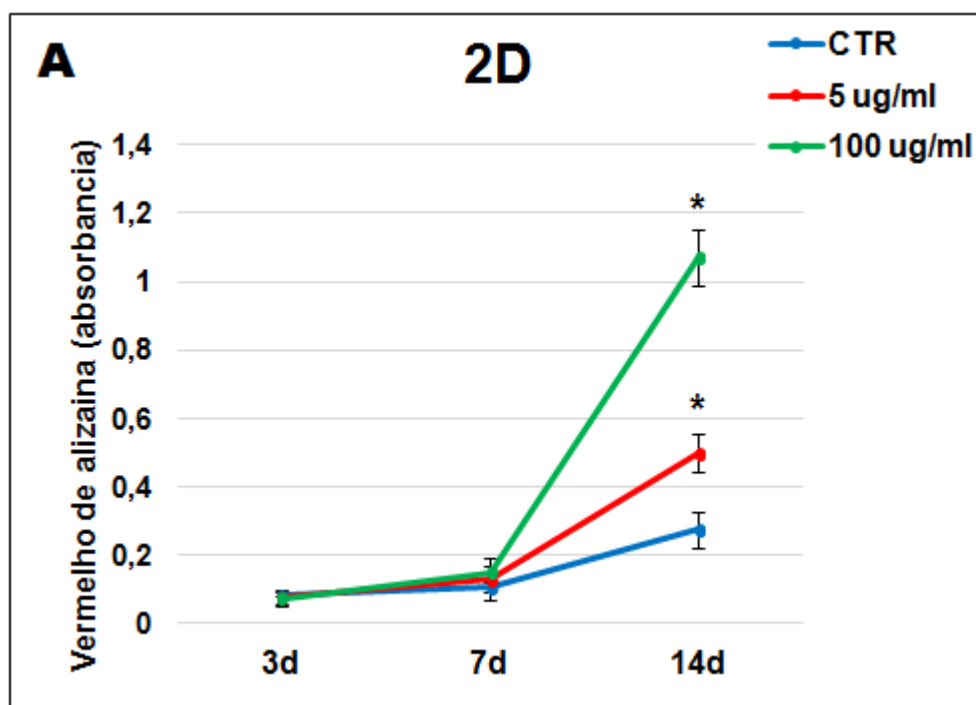
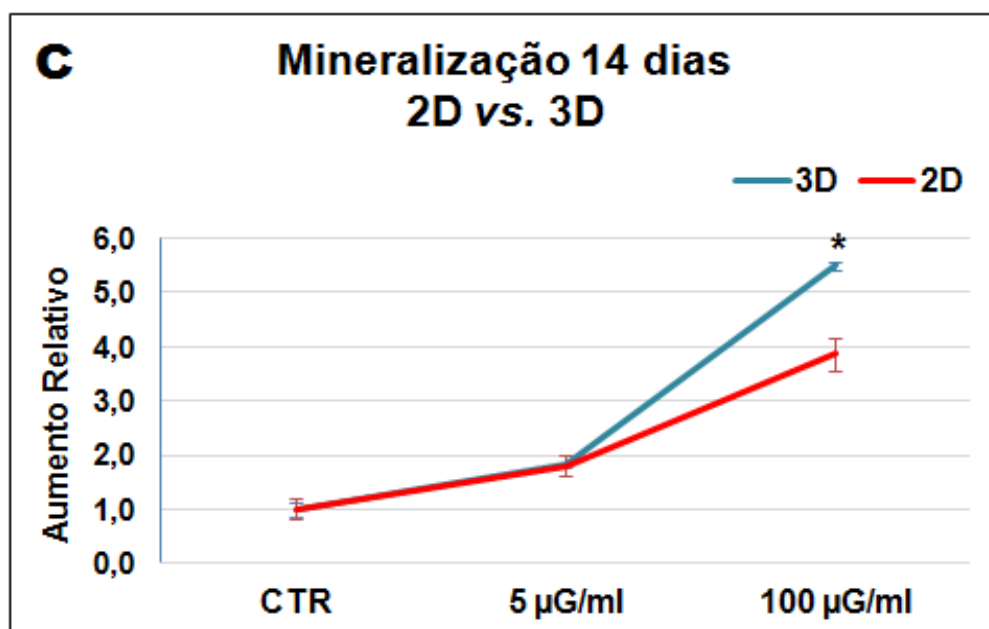
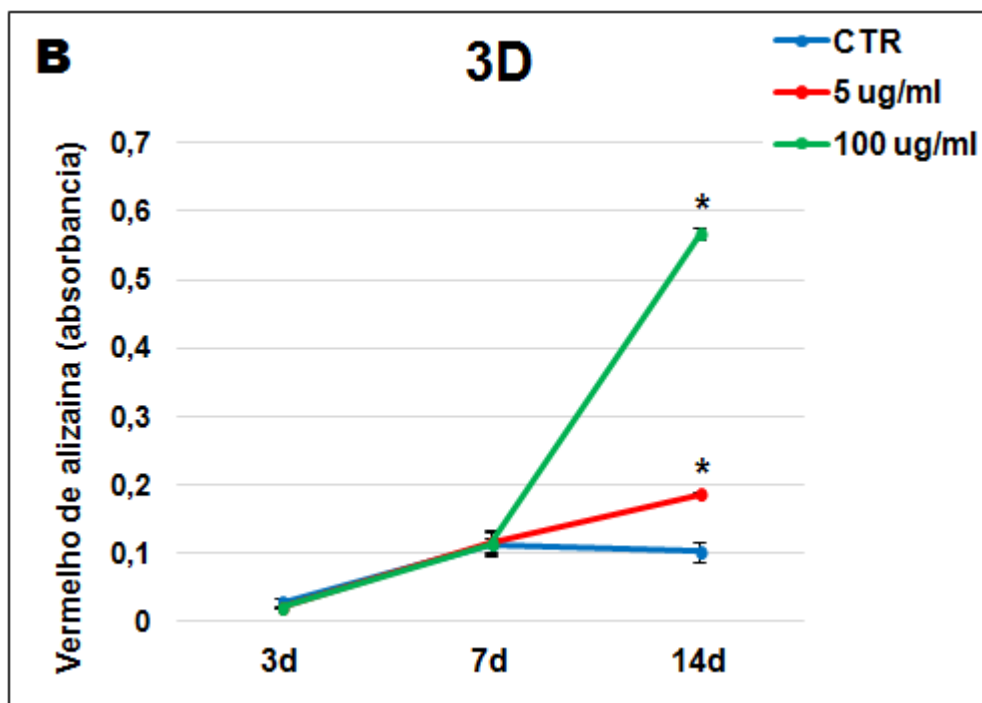


Figura 3 Viabilidade de células SAOS2 2D e 3D. As células foram expostas a TiO₂ nanoestruturado (0-5-100 µg/ml) durante 3 e 21 dias e o ensaio de PI/Anexina foi realizado mostrando ausência de citotoxicidade em todas as concentrações e tempos testados. resultados são a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Para avaliar a produção de matriz inorgânica foi realizado o ensaio de vermelho de alizarina após a exposição tempo-dependente das células a TiO_2 nanoestruturado (0-5-100 $\mu\text{g/ml}$) durante 3, 7 e 14 dias. Os resultados mostram um aumento significativo dose-dependente da mineralização com 14 dias comparado com o controle, tanto em 2D quanto em 3D (Figura 4 A e B). Além disso, foi evidenciado que, em 14 dias, a normalização pelo controle mostra que este aumento é maior no modelo 3D comparado com o modelo 2D, sugerindo que os dois modelos podem apresentar resultados diferentes na avaliação da mineralização (Figura 4C). As imagens representativas deste experimento são mostradas em Figura 4D.





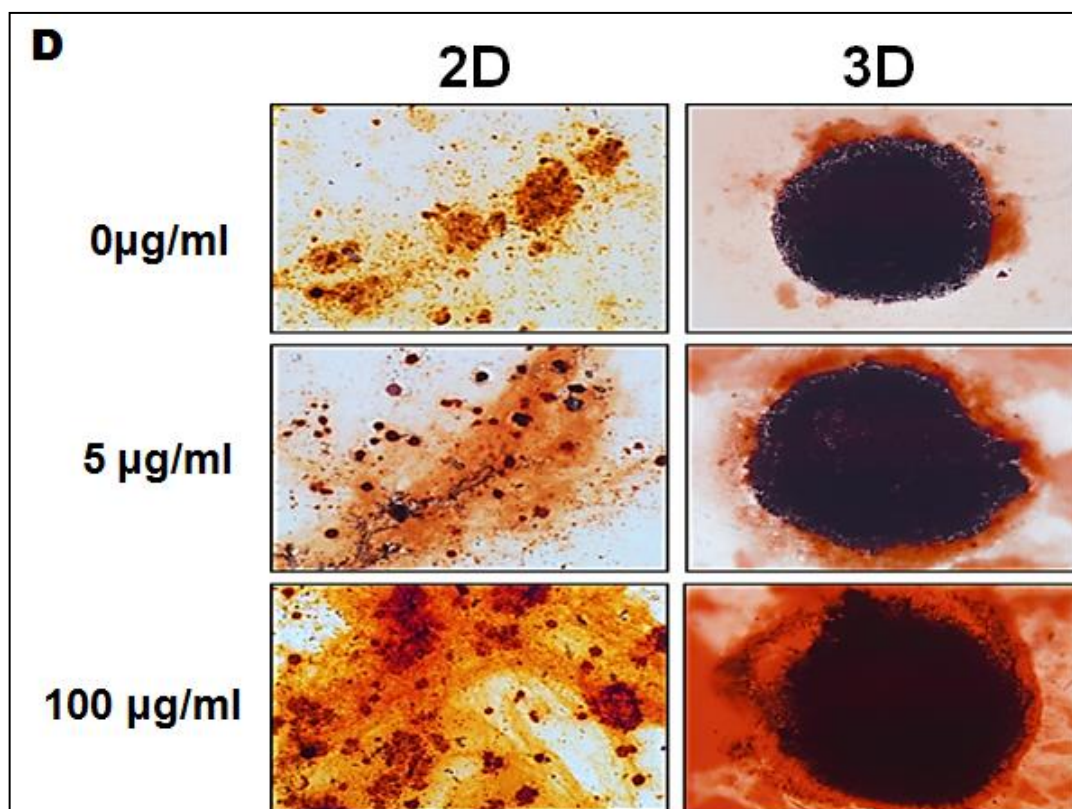


Figura 4. Produção de matriz mineralizada por células SAOS2 2D e 3D. As células foram expostas a TiO₂ nanoestruturado (0-5-100 µg/ml) durante 3 e 21 dias em meio osteogênico. A produção de matriz mineralizada foi avaliada através do teste de Vermelho de Alizarina mostrando uma produção de matriz dose-dependente em ambos os modelos, com uma quantidade maior produzida pelos modelos 3D comparado com os modelos 2D. Os gráficos apresentam resultados baseados na média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. O primeiro gráfico (A) mostra os resultados avaliados acerca da quantidade de mineralização em modelo 2D, enquanto o segundo (B), em modelo 3D. O terceiro gráfico (C) mostra um comparativo direto entre a produção de matriz inorgânica nos modelos 2D e 3D ao final de 14 dias. A última figura (D) são imagens obtidas através de microscopia, onde mostra a presença de mineralização através da marcação com Vermelho de Alizarina. *p 0.05 vs controle.

5 DISCUSSÃO

É irrefutável a importância que a nanotecnologia e os nanomateriais desenvolvem na sociedade atual pelas suas variadas aplicações e benefícios decorrentes. No entanto, para gerar produtos seguros é essencial que a regulamentação em segurança e o desenvolvimento nanotecnológico caminhem lado a lado (32).

O dióxido de titânio em forma macro é o padrão ouro usado nos implantes dentários. Contudo, este material é sujeito ao desgaste provocado pelo ambiente bucal e libera partículas que interagem com os tecidos circunstantes. As nanopartículas de dióxido de titânio são estáveis, possuem propriedades

antibacterianas, biocompatíveis e menos tóxicas que outras nanoestruturas, tornando-os excelentes candidatos para aplicações biomédica e odontológica. Quando expostas ao ambiente biológico, proteínas seletivas e íons podem adsorver nas nanoestruturas, criando uma interface nano-biodinâmica que media uma resposta celular. Essa complexa interface depende das características físico-químicas das nanoestruturas, bem como das características biológicas do meio. A interação entre implantes de titânio e células ou tecidos adjacentes deve ser estudada tendo presente as micro e nanopartículas liberadas dos implantes para os tecidos contíguos. Eles podem interagir com as células circunstantes e já aderidas ao implante, mas também podem ser levados com fluidos de tecidos até células ósseas distantes. A inflamação local facilita a migração de partículas de titânio, aumentando o fluxo de líquidos intercelulares nos tecidos inflamados.

Nossos estudos mostram uma ausência de citotoxicidade após a exposição das células de osteoblastos ao TiO₂ nanoparticulado e um aumento dose dependente da formação da matriz mineralizada tanto no modelo 2D quanto no modelo 3D. A interação do implante com células ósseas adjacentes que precisam aderir e se espalhar pelo implante, a fim de depositar um novo osso em sua superfície e promover uma integração mecânica e biológica estável das estruturas pode ser modificada por estas partículas liberadas. A compatibilidade da superfície do implante com as células ósseas tem sido objeto de extensos estudos, onde as propriedades físicas e químicas da superfície de titânio mostraram-se relevantes para a integração ideal entre célula e implante. Contudo, a maioria destes estudos são realizados em superfícies em micro e macroescala (33, 34, 35, 36).

O aumento progressivo dos contatos de células aderentes com substratos sólidos induz a propagação destas células, até cobrir toda a superfície disponível e formar uma camada contínua (37, 38, 39, 40). O tecido ósseo mineralizado se organiza em nanoestruturas em padrões helicoidais. Por isso, os nanomateriais podem apresentar uma resposta ainda mais efetiva do ponto de vista da osteointegração comparada aos macromateriais, por atingirem as menores regiões do tecido ósseo (41).

Nesse ponto, sobre a liberação de nanopartículas de titânio e as possíveis consequências biológicas que isso poderia causar, estudos mostraram, através de mapas de Espectrometria de Energia Dispersiva (EDS), que as NPs de TiO₂ são internalizadas de forma dose-dependente, tendo como destino vesículas com

membrana bem definida, produzindo uma invaginação da membrana em torno das nanopartículas (NPs), não sendo visualizadas NPs dispersas no citoplasma celular (42, 43, 44). Outros estudos mostraram a influência da rota de processamento no tamanho e distribuição das NPs e sua forma cristalográfica. Como frequentemente acontece, as NPs de TiO₂ apresentam características distintas quando comparados a partículas da mesma composição química em macroescala. Isso principalmente é devido à sua alta área superficial específica, apresentando o TiO₂ nanoparticulado maior reatividade e podendo aumentar sua bioatividade.

Ribeiro et al. (2016)⁴⁵ demonstraram que as nanopartículas de anatase expostas ao osteoblasto humano primário eram muito facilmente internalizadas pelas células sem interferir com a citotoxicidade. Apenas em concentrações mais altas é possível observar um atraso na proliferação celular mostrado por análise do ciclo celular, que pode resultar em um aumento da diferenciação celular, que corrobora com nossos resultados de aumento de mineralização. Outro estudo indica um aumento na atividade da fosfatase alcalina e produção de colágeno tipo I, resultando em um aumento na produção da matriz orgânica. Ainda sim, a grande maioria dos estudos que envolvem titânio utiliza de sua forma macro, logo, existem muitas lacunas em nosso conhecimento em relação à correlação entre a toxicidade das partículas derivadas de nanomateriais e a biointerface das células ósseas que tentaremos preencher através deste estudo (45).

Mesmo sendo indiscutível que macro e nanoescala apresentam características completamente diferentes e que as mesmas nanopartículas podem gerar interferência nos testes comumente usados para avaliação de citotoxicidade e atividade biológica em nanoescala, não existe ainda nenhuma regulamentação nacional nem internacional ou protocolos acordados para os testes após a exposição às nanopartículas. Sem protocolos padronizados para avaliar os impactos biológicos de nanopartículas, se faz necessária a validação de avaliações seguras, mitigando potenciais impactos à saúde e o ambiente caminhando para avaliar e desenvolver novos modelos de estudo celular para melhorar as informações provenientes dos estudos *in vitro* e otimizar a mimetização do ambiente biológico *in vivo*. (32).

Alguns trabalhos já relatam o uso de modelos 3D de tecido ósseo humano com um futuro promissor para melhor mimetização de interface. Quando o assunto é modelagem e simulação da formação de tecido ósseo, uma das estratégias aplicadas na biofabricação é a utilização de esferoides teciduais como unidade básica dos

processos biológicos com o intuito de melhor explorar o nicho tridimensional (3D) do ambiente celular, diferentemente das culturas bidimensional (2D). O uso de estruturas tridimensionais possibilita maior capacidade de diferenciação celular, melhor exploração dos gradientes de difusão de nutrientes e de oxigênio, melhores interações entre as células e um maior dimensionamento da deposição da matriz óssea. Isso porque a disposição das células em esferoides, mimetiza fielmente o microambiente *in vivo* (46, 47).

Ainda faltam estudos envolvendo nanopartículas e modelos 3D de tecido ósseo para análise de mineralização. Recentemente, os implantes de titânio osseointegrados mais disponíveis clinicamente tentam imitar estrutura hierárquica do osso, incorporando algum tipo de modificação da superfície combinando recursos de micro e nanoescala (48). Além de esclarecer as diferenças entre dois modelos 2D e 3D na avaliação da osteointegração, nossos resultados abrem a possibilidade de integrar os implantes com esferoides de células ósseas que possam responder a liberação de nanopartículas na superfície aumentando assim a interface de matriz mineralizada entre osso e implante e, conseqüentemente, a osteointegração.

6 CONCLUSÃO

A dispersão das nanopartículas de TiO_2 foi realizada com sucesso, obtendo partículas em escala nanométrica, que mantém seu tamanho após o contato com meio de cultivo.

As células expostas às nanopartículas de TiO_2 nas concentrações de 5 e 100 $\mu\text{g/ml}$ permanecem viáveis tanto no modelo 2D quanto no 3D até 21 dias de exposição.

A produção de matriz inorgânica é dose-dependente em ambos os modelos, tiveram maior produção de matriz inorgânica em 14 dias e em modelo de esferóides quando comparado à monocamada.

Estes resultados abrem as portas para novos modelos de estudos para materiais nanoestruturados e nanoparticulados, cuja regulamentação é escassa e a ausência de toxicidade e a maior produção de matriz inorgânica mostrados nos modelos 3D demonstra uma possível associação de modelos esferoidais com implantes para melhorar a osteointegração aumentando a camada de hidroxiapatita na interface implante/osso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costa e Silva A, Mei PR. Aços e Ligas Especiais. 3. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2010.
2. Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement — a materials science perspective. *Biomaterials*, 1998 19 (18):1621-1639.
3. Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2004 27(3-4): 49-121.
4. Lemons JE, Misch FD. Biomateriais utilizados em implantes dentários. In: Misch CE. *Implantes dentais contemporâneos*. 3ª ed. Santos (SP): Elsevier; 2000. p. 271-277.
5. THE ELEMENT TITANIUM. [Thomas Jefferson National Accelerator Facility - Office of Science Education]. Newport News, [atualizado 2020 Nov 12; Acesso em 2020 Nov. 13]. Disponível em: <https://education.jlab.org/itselemental/ele022.html>.
6. Bauer JRO, Schroeder M, Loguercio AD, Rodrigues Filho LE, Muench A. Titânio e ligas de titânio: propriedades e técnicas de fundição. *Rev Pos Grad USP*, 2002 9(2):179-85.
7. Virtanen S, Milošev I, Gomez-Barrena E, Trebše R, Salo J, Kontinen YT. Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions. *Acta Biomaterialia* 2008 4(3): 468–476.
8. Gupta V, Grande-Allen KJ. Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc Res* 2006 72(3): 375-83.

9. Hollinger JO. Consensus definitions, fundamental concepts, and a standardized approach to applied biomaterials sciences. In: Hollinger JO. An Introduction to Biomaterials. 2. ed. New York (NY): Taylor and Francis Group, 2012 p. 1–4.
10. Rho J, Aahman R, Turner C. Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements. J Biomech. 1993; 26(2):111-19.
11. Breme J, Biehl V. Metallic Biomaterials. In: Murphy W, Black J, Hastings H. Handbook of biomaterials properties. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2016 p. 676.
12. Cordeiro JM, Barão, VAR. Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? Materials Science and Engineering C 2017; 71: 1201–1215.
13. Donato TAG, De Almeida LH, Nogueira RA, Niemeyer TC, Grandini CR, Caram R, Schneider SG, Santos AR. Cytotoxicity study of some Ti alloys used as biomaterial. Materials Science and Engineering C 2009; 29(4): 1365–1369.
14. Fabreguette F. Caracterisation de couches minces et de multicouches nanometriques a base d'oxynitride de titane elaborée par LP-MOCVD. Tese. Bourgogne: Université de Bourgogne, 2000.
15. Wang W. Self-induced synthesis of phase-junction TiO₂ with a tailored rutile to anatase ratio below phase transition temperature. Sci. Rep.: Nature Publishing Group 2016; 6: 1-11.
16. Su R. How the Anatase-to-Rutile Ratio Influences the Photoreactivity of TiO₂. J. Phys. Chem. C 2011; 115 (49): 24287-24292.
17. Florencio SR, Sasso GRS, Cerri ES, Simões MS, Cerri OS. Biology of Bone Tissue: Structure Function, and Factors That Influence Bone Cells. BioMed Research International 2015; 2015: 1-17.

18. Buckwalter JA. Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. Instructional Course Lectur 1996 45: 371– 386.
19. Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. Physical Therapy 2006; 86(1): 77–91.
20. Datta HK. The cell biology of bone metabolism. Journal of Clinical Pathology 2008; 61(5): 577–587.
21. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. Osteoporosis International 2006; 17(3): 319-336.
22. Berger JM, Singh P, Khrimian L, Morgan DA, Chowdhury S, Arteaga-Solis E et al. Mediation of the Acute Stress Response by the Skeleton. Cell Metabolism 2019; 30: 890–902.
23. Nordin M, Frankel VH. Biomecânica Básica do Sistema Musculoesquelético. 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.
24. Kierszenbaum BL, Tres LL. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. 3º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
25. Ross MH.; Pawlina W. Histologia – Texto e Atlas. 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.
26. Junqueira LCU, Carneiro J. Biologia Celular e Molecular. 8ª. Ed. Editora Guanabara. Koogan, Rio de Janeiro, 2005.
27. Andia DC, Cerri PS, Spolidorio LC. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. Revista de Odontologia da UNESP, Araraquara 2006; 35(2): 191-198.
28. Baelum V, Luan WM, Chen X, Fejerskov O. Predictors of tooth loss over 10 years in adult and elderly Chinese. Community Dent Oral Epidemiol. 1997; 25(3): 204-10.

29. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Projeção da população do Brasil por sexo e idade 1980- 2050: Rio de Janeiro: **IBGE**, 2008. [Atualizado em 2008; Acesso 2020 nov 12]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv41229.pdf>
30. Lekholm U, Gunne J, Henry P, Higuchi K, Lindén U, Bergström C et al. Survival of the Brånemark implant in partially edentulous jaws: a 10-year prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 639-645.
31. Alghamdi, HS., Jansen, JA. The development and future of dental implants. *Dental Materials Journal* 2020; 39(2): 167–172.
32. Ferreira AP, Sant’anna LS. A Nanotecnologia e a Questão da sua Regulação no Brasil: Impactos à Saúde e ao Ambiente. *Revista UNIANDRADE* 2015; 16(3): 119-128.
33. Camargo W, Takemoto S, Hoekstra JW, Leeuwenburgh S et al Effect of surface alkali-based treatment of titanium implants on ability to promote in vitro mineralization and in vivo bone formation. *Acta Biomaterialia* 2017 57: 511-523.
34. Doi K, Kubo T, Makihara Y, Oue H, Morita K, Oki Y et al. Osseointegration aspects of placed implant in bone reconstruction with newly developed block-type interconnected porous calcium hydroxyapatite. *J. Appl. Oral Sci.* 2016; 24(4): 325-331.
35. Marenzi G, Impero F, Scherillo F, Sammartino JC, Squillace A, Spagnuolo G. Effect of Different Surface Treatments on Titanium Dental Implant Micro-Morphology. *Materials* 2019; 12: 733.
36. Leocádio ACS. Osseointegração de implantes com diferentes macro e microestruturas instalados em áreas sem enxertia ou com osso bovino desproteinizado associado ou não à medula óssea fresca: estudo pré-clínico em

coelhos. Tese. São Paulo (SP): UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2020.

37. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: 172–184.

38. Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007; 23: 844–854.

39. Anselme K, Ponche A, Bigerelle M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: J Eng Med* 2010; 224: 1487–1507.

40. Ehrenfest DMD, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol* 2010; 28: 198–206.

41. Reznikov N, Bilton M, Lari L, Stevens MM, Kröger R. Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale. *Science* 2018; 360: 2189.

42. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2007, 2(4): 17-71.

43. Arora S, Rajwade JM., Paknikar KM. Nanotoxicology and *in vitro* studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 258: 151–165.

44. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* 2008; 4: 26–49.

45. Ribeiro AR, Gemini-Piperni S, Travassos R, Lemgruber L, Silva RC, Rossi AL, Farina M, Anselme K, Shokuhfar T, Shahbazian-Yassar R, Borojevic R, Rocha LA, Werckmann J, Granjeiro JM. Trojan-like internalization of Anatase titanium dioxide nanoparticles by human osteoblast cells. *Sci Rep.* 2016; 6: 23615.

46. Yamaguchi Y, Ohno J, Sato A, Kido H, Fukushima T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. BMC Biotechnology 2014; 14:105.
47. Kersanach MB, Dernowsek JA, Silva J.L.V. Modelagem e simulação da formação de tecido ósseo. ENEBI 2018 – 6º Encontro Nacional de Engenharia Biomecânica. 8 e 11 de maio de 2018, Águas de Lindóia – SP.
48. Gutwein LG, Webster TJ. Increased viable osteoblast density in the presence of nanophase compared to conventional alumina and titania particles. Biomaterials. 2004; 25:4175–83.