**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

PAULO HENRIQUE MOLIN

**Biocompatibilidade e osteointegração de células
osteoblásticas em contato com nióbio**

**São Carlos
2016**

Paulo Henrique Molin

**Biocompatibilidade e osteointegração de células
osteoblásticas em contato com nióbio**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. João Manuel Domingos de Almeida
Rollo

São Carlos,

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Molin, Paulo Henrique
MM722b Biocompatibilidade e osteointegração de células
osteoblásticas em contato com nióbio / Paulo Henrique
Molin; orientador João Manuel Domingos de Almeida
Rollo. São Carlos, 2016.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2016.

1. Biocompatibilidade. 2. osteointegração. 3.
nióbio. 4. material de implante. I. Título.

Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

PAULO HENRIQUE MOLIN

Título: *"Biocompatibilidade e osteointegração de células osteoblásticas em contato com nióbio"*

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM
BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE
BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 29/01/2016

Prof. Dr. João Manuel Domingos de Almeida Rollo Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP

Assinatura: _____

Resultado: _____

APROVADO

Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" - UNESP

Assinatura: _____

Resultado: _____

Aprovado

Profa. Dra. Marcia Cristina Branciforti

Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP

Assinatura: _____

Resultado: _____

Aprovado

Homologado em: ____ / ____ / ____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Lourdes e José Paulo, pelo auxílio emocional e suporte acadêmico oferecido todos esses anos, que com muito apoio e persistência guiaram para onde eu estou hoje.

Ao meu irmão Paulo Guilherme, pelos momentos de incentivo, esclarecimentos, orientações e exemplo de profissional.

À minha namorada, Gabriela, por esses incansáveis 11 anos juntos.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

AGRADECIMENTOS

À Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM) pela parceria e fornecimento do nosso material de estudo, o nióbio produto bruto de fusão.

À Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Manuel Domingos de Almeida Rollo pela orientação deste trabalho, pelo apoio e auxílio oferecidos para a pesquisa científica e por proporcionar liberdade no ambiente de trabalho.

À Marcia Maria Hyppolito Geromini, secretária do Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - EESC/FMRP/IQSC – USP, pela sua paciência, carisma e atuação no PPG; sua ajuda foi, sem dúvida, muito importante.

A todos os alunos do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar pelas amizades, alegria, assistência e sugestões.

À Luciana Bueno dos Reis Fernandes pelo auxílio e condução dos ensaios de estereomicroscopia do DEBE – UFSCar.

Ao Renato Belli Strozi pelos esclarecimentos, informações, auxílio no Laboratório de Caracterização Estrutural da Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, acima de tudo, pela amizade.

Aos amigos Vinícius Lucena e Caio Perecin pela amizade e convívio em nossa República do Fofo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, Coordenadora do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, pela possibilidade de permanência no laboratório de sua Coordenação dispondo de materiais e equipamentos, contando com parceria inigualável de trabalho. Sem a sua cooperação por certo este trabalho não seria possível. Meus sinceros agradecimentos!

À Caroline Belanni e Dra. Sabrina Pevianni Messa pelo apoio imprescindível e necessário na parte técnico-científica desta pesquisa; pelo companheirismo e auxílio no convívio no laboratório. Grato pela presença de vocês no dia a dia, vocês foram incomparáveis.

“99% dos sucessos são construídos em cima dos erros”

Charles Kettering

RESUMO

MOLIN, P.H. **Biocompatibilidade e osteointegração de células osteoblásticas em contato com nióbio**. 2016. 46p. Dissertação Mestrado – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

O nióbio possui potencial para ser um metal de grande aplicabilidade, tanto na engenharia como na área médica; porém a literatura médica a respeito deste material é escassa. Para que o nióbio de pureza 97,47% possa ser utilizado como material de implante e permita a osteointegração se faz necessário avaliá-lo quanto a sua biocompatibilidade e potencial de mineralização. Para tanto é importante compreender os eventos celulares e moleculares que ocorrem na interface nióbio-célula. Neste estudo foram utilizadas as técnicas laboratoriais de Alamar Blue, coloração de Alizarin Red, assim como a expressão de genes, importantes na ocorrência de mineralização e manutenção das células osteoblásticas, utilizando a técnica de qPCR. As células em contato direto com o nióbio obtiveram atividade celular indiferente em relação ao material controle. O nióbio possibilita a aposição de depósitos de cálcio e a adesão celular em sua superfície, comprovando a osteoindução, osteocondução e osteogênese. A análise do qPCR comprovou estatisticamente pelo método Livak que o nióbio é um material com potencial de osteointegração. O entendimento dos resultados obtidos nos testes de biocompatibilidade, mineralização e expressão gênica comprovaram que o metal nióbio é biocompatível e possui propriedades osteointegrativas, pode ser indicado como um material para implante e que permite a osteointegração.

Palavras-chave: Biocompatibilidade, osteointegração, nióbio, material de implante.

ABSTRACT

MOLIN, P.H. Biocompatibility and osteointegration of osteoblastic cells in contact with niobium. 2016. 46p. Mater Degree Dissertation – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Niobium has the potential to be a metal with wide applicability in engineering and in the medical field; but the medical literature regarding the behavior of this material is scarce. It is required to evaluate the biocompatibility and mineralization of the niobium (94,47% purity) if it would be used as an implant material and osteointegrate material. Therefore, it is important to understand the cellular and molecular events that occur in the material-cell interface. In this study we used laboratory techniques of Alamar Blue, Alizarin Red staining, as well as gene expression of important genes in the mineralization and maintenance of osteoblastic cells by qPCR technique. The cells in direct contact with the niobium obtained indifferent cellular activity compared to the control material. Niobium allowed affixing calcium deposits and cell adhesion on its surface, proving its osteoinductive, osteoconductive and osteogenesis properties. The qPCR analysis proved statistically by Livak method that niobium is a material with osseointegration potential. An understanding of the biocompatibility, mineralization and gene expression led us to conclusion that the niobium metal is biocompatible and with osteointegrative properties which can be indicated as an implant material that allows osteointegration.

Keywords: Biocompatibility, osteointegration, niobium, implant material

SUMÁRIO

1	Introdução.....	11
1.1	Nióbio.....	11
1.2	Biocompatibilidade.....	13
1.3	Viabilidade celular.....	14
1.4	Osteogênese, Osteocondução e Osteoindução - Osteointegração.....	15
1.5	Sistema <i>in vitro</i>	16
1.6	Interface célula-material.....	16
1.7	Expressão gênica.....	17
1.7.1	Moléculas de adesão celular (Integrina $\alpha 2$).....	19
1.7.2	Proteínas da Matriz Extracelular (MEC) e moléculas indicadoras de reparo ósseo (Colágeno tipo I, Osteocalcina).....	20
1.7.3	Marcador de sinalização celular - Proteína Citoplasmática Tirosina Kinase (FAK).....	21
1.8	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (qPCR).....	22
2	Objetivo.....	25
3	Justificativa.....	25
4	Materiais e métodos.....	26
4.1	Material Nióbio.....	26
4.2	Corpos de provas.....	26
4.3	Cultura celular.....	26
4.4	Viabilidade celular.....	27
4.5	Mineralização celular.....	27
4.6	Extração do RNA.....	28
4.7	Confecção do cDNA.....	28
4.8	Primers.....	28
4.9	qPCR.....	29
4.10	Análise estatística	30
4.10.1	Viabilidade celular	30
4.10.2	qPCR.....	30
5	Resultados e discussão.....	31
5.1	Viabilidade celular.....	31
5.2	Mineralização celular.....	32
5.3	Expressão Gênica.....	34
5.3.1	Colágeno tipo I.....	34
5.3.2	Integrina $\alpha 2$	35
5.3.3	Proteína Citoplasmática Tirosina Kinase (FAK).....	36
5.3.4	Osteocalcina.....	38
6	Conclusão.....	39
7	Sugestão de estudos	39
8	Referências Bibliográficas.....	40

1 Introdução

1.1 Nióbio

O nióbio (Nb) de número atômico 41 (figura 1), muito utilizado como elemento de liga na fabricação de aços especiais, é um metal resistente à corrosão e a altas temperaturas, sendo de fundamental importância para a indústria metal mecânica [1]. O Brasil detém 98% das reservas naturais conhecidas mundialmente, concentradas nos estados de Minas Gerais (73,11%), Amazonas (25,42%) e Goiás (1,47%). Mantendo a liderança na oferta de nióbio no cenário mundial, com participação de 92,4% da produção mundial deste metal [2].

Abundância (mg/kg)	20	Número Atômico	41	Ponto de Fusão (°C)	2477
Estado de oxidação	+2 +3 +4 +5			Ponto de Ebulição (°C)	4744
Massa Atômica	92.906 38 (2)			Densidade (g/cm³)	8.57
Configuração Eletrônica	[Kr] 4d ⁴ 5s ¹			Símbolo	Nb

Figura 1 – Posicionamento do Nb na tabela periódica [3].

O nióbio possui potencial para ser um metal de grande aplicabilidade tanto na engenharia como na área médica; porém a literatura médica a respeito do seu comportamento em contato com o meio tecidual biológico é escassa. Uma das propriedades interessantes do nióbio é ser leve quando comparado com os outros metais refratários (tabelas 1 e 2). A caracterização mecânica deste material pode ser realizada utilizando ensaio de tração convencional como também ensaio de microdureza Vickers, que estabelecem valores que indicam aplicações de seu uso [4, 5]. A tabela 1 exhibe os valores da densidade e ponto de fusão dos materiais refratários. A aplicabilidade é dependente do valor atribuído ao material, usinabilidade e módulo de elasticidade. Dentre os metais refratários o nióbio é o que possui menor densidade, semelhante ao do aço inoxidável F-138.

<i>Composto</i>	<i>Densidade (g cm⁻³)</i>	<i>Ponto de Fusão (°C)</i>
Nióbio	8,57	2477
Tungstênio	19,3	3422
Molibdênio	10,22	2623
Tântalo	16,6	3017
Rênio	21,2	3180
Háfnio	13,1	3500

Tabela 1 -Densidade e Ponto de Fusão de alguns metais refratários. [6].

<i>Material</i>	<i>Estricção RA (%)</i>	<i>Limite de ruptura σ_r (MPa)</i>	<i>Limite de escoamento σ_e (MPa)</i>	<i>Módulo de elasticidade E (GPa)</i>	<i>Microdureza Vickers (HV)</i>	<i>Densidade (g cm⁻³)</i>
Nióbio	90	349	267	105	58,9	8,57
Aço Inox F 138	80	594	246	210	180	8
Aço Inox ISO 5832-9	68	861	496	200	200	7,98
Titânio cp	66,6	550	414	107	177,5	4,51
Osso cortical		90-140	80	10-40	~40	~2

Tabela 2 - Propriedades mecânicas e físicas do nióbio puro em comparação com aços inoxidáveis, titânio cp e osso cortical [6, 7] .

A citotoxicidade, capacidade de causar efeito adverso às células, é dependente da tendência de ionização dos metais. Metais refratários, tais como as ligas de cobalto, cromo, tântalo, e titânio (Ti) são utilizados como materiais de implantes, uma vez que têm excelente resistência à corrosão em meios corpóreos. O alumínio (Al) e vanádio (V) podem ser incorporados em forma de liga Ti-6Al-4V [8], no entanto causam preocupação, pois o alumínio é um inibidor de crescimento ósseo e causa a doença de Alzheimer, e o elemento vanádio é citotóxico [9-14]. Com isso, suspeita-se que implantes confeccionados de Ti-6Al-4V possam ter um efeito prejudicial no organismo receptor devido à ionização destes metais, mesmo possuindo propriedades mecânicas compatíveis à implantes. Segundo Wang et al. [15] no intuito de desenvolver biomateriais que minimizassem os efeitos adversos causados por estes elementos químicos, houve um desenvolvimento de ligas à base de titânio que utilizassem elementos como nióbio (Nb), zircônio (Zr) e tântalo (Ta), que permitem melhorar as propriedades mecânicas e prevenir a ionização do material. Com isso, foram desenvolvidas ligas de Ti-6Al-7Nb [16, 17] e Ti-5Al-13Ta [18], em

que os metais do grupo 5B, Nb e Ta substituem o elemento vanádio e ligas de Ti-13Zr-13Nb [19, 20], em que o Al foi substituído por Zr. As propriedades mecânicas e de biocompatibilidade destas ligas já foram investigadas, porém estudos mais detalhados desses compostos independentes precisam ser realizado [21-24].

1.2 Biocompatibilidade

A biocompatibilidade é um termo que abrange vários aspectos do material, incluindo desde suas propriedades físicas, mecânicas e químicas até seu potencial citotóxico, alergênico e mutagênico, não apresentando efeitos tóxicos ou causando injúrias na função biológica [21].

De maneira geral, um biomaterial é compreendido como qualquer substância que pode ser usada por qualquer período de tempo como parte de um sistema que objetive o tratamento ou a reposição de qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Poucos materiais, ou talvez nenhum, são totalmente inertes do ponto de vista fisiológico, visto que a grande maioria apresenta uma variedade de componentes com potenciais tóxicos ou irritantes [21, 25].

Os materiais para implantes são classificados segundo a sua biocompatibilidade: biotolerantes, bioinertes e bioativos [21, 22, 26-28]. Os materiais biotolerantes são aqueles que não são necessariamente rejeitados quando implantados em tecido vivo, mas são rodeados por tecido conjuntivo fibroso na forma de cápsula (com exemplo, metais como ouro, liga de cromo-cobalto, aço inoxidável F132 e zircônio). Os bioinertes são aqueles que permitem a formação de osso em sua superfície, levando a uma osteogênese de contato (como exemplo, titânio comercialmente puro e ligas de titânio). Os materiais bioativos também permitem a formação de osso em sua superfície através de trocas iônicas, levando a formação de uma interface com ligações químicas com o material (com exemplo, hidroxiapatita, fosfato tricálcico e fluorapatita). Os implantes metálicos bioinertes e bioativos também são chamados de osteocondutores, significando que podem atuar como “scaffold”, ou seja, uma estrutura que permite o crescimento ósseo em sua superfície [29]. Sendo assim, é de fundamental importância avaliar a classificação do elemento nióbio puro segundo sua biocompatibilidade.

A biocompatibilidade dos materiais é evidenciada pelo comportamento das células quando em contato com a superfície do implante e pela adesão celular a este. A adesão e o espalhamento pertencem à primeira fase da interação célula/material e a qualidade desta interação influenciará a capacidade celular de proliferar e diferenciar em contato com o implante [29, 30].

A interface de contato entre o meio biológico e os biomateriais deve proporcionar ao organismo condições adequadas de biocompatibilidade e biofuncionalidade. É necessário que os eventos celulares e biomoleculares que ocorrem durante a osteogênese apresentem condições para reparo rápido, contribuindo para o desenvolvimento de novos sistemas de implante e a compreensão da biologia óssea [31].

Diversos estudos avaliaram diferentes implantes e suas características, bem como sua biocompatibilidade e sua capacidade osteogênica. Estudos realizados em 2001 [32] por Matsuno et al. avaliaram a biocompatibilidade e a osteogênese de diversos implantes de metais refratários inseridos em formato de “pellets” em fêmur de camundongos *in vivo*. Neste estudo utilizaram os metais refratários titânio, háfnio, tântalo, rênio e nióbio. Análises histomorfológicas deste estudo evidenciaram que não houve rejeição do material implantado e a qualidade da osteogênese é dependente do tipo de metal e o tempo em contato com o material biológico, porém trata-se de um estudo *in vivo*, necessitando uma análise mais detalhada *in vitro*.

1.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular determina a taxa de sobrevivência celular, está relacionada à citotoxicidade e atividade celular. Muitos estudos utilizam a técnica de Alamar Blue para determinar a atividade celular [33-35]. A resazurina, conhecida comercialmente por Alamar Blue, serve como indicador de oxidação-redução. A forma oxidada do Alamar Blue apresenta-se não fluorescente com coloração azul. Este composto pode ser reduzido intracelularmente a resofurin, composto de coloração rosa e fluorescente, como demonstra na figura 2, permitindo uma avaliação da atividade celular metabólica por leitura fluorescente. Assim, a análise da alteração por espectrometria do Alamar Blue é um método rápido, sensível e não citotóxico para

analisar a viabilidade celular, contribuindo para a investigação de mecanismos de proliferação e toxicidade em modelos celulares [33, 34].

Figura 2 – Oxi-redução intracelular da resazurina a resofurina [36]

1.4 Osteogênese, Osteocondução e Osteoindução - Osteointegração

Apesar de o tecido ósseo apresentar alto potencial de regeneração, este aspecto pode não apresentar defeitos de grandes dimensões. Nestes casos é necessária a utilização de materiais que favorecem a regeneração óssea [37].

Os biomateriais podem promover a neoformação óssea através de três mecanismos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. Osteogênese é a formação de osso novo proveniente de células osteocompetentes [38]. A osteoindução refere-se à capacidade de muitas substâncias químicas normais do corpo estimularem células-tronco primitivas ou células ósseas imaturas a crescerem e amadurecerem em células osteoblásticas, células formadoras de osso. Normalmente estes estímulos são sinais de moléculas denominadas de fatores de crescimento peptídeos ou citocinas, que são produzidas pelas células ósseas e outras células locais [39]. Já osteocondução se refere à capacidade de alguns materiais servirem de armação sobre a qual células ósseas podem se fixar, migrar, crescer e se dividir [40, 41].

O ideal seria possuir um material que pudesse induzir os três mecanismos de neoformação. Com isso, permitiria osteointegração [40], ou seja, formação de osso na superfície do material, integrando o material com o osso.

Para quantificar os três tipos de mecanismos de neoformação óssea são necessários testes de expressão gênica para as citocinas, assim como testes de

mineralização para a formação inorgânica do osso. A análise qualitativa da mineralização é realizada pela marcação com Alizarin Red-S (Sigma), que é um corante derivado de antraquinona que pode ser utilizado para identificar depósitos de cálcio em secções de tecidos e células em cultura *in vitro* [42, 43]; consequentemente, é utilizado para determinar a neoformação óssea.

1.5 Sistema *in vitro*

Sistemas *in vitro* proporcionam a oportunidade de examinar, em um ambiente controlado, eventos celulares e extracelulares que ocorrem durante a formação óssea [44]. Os modelos *in vitro* podem auxiliar no esclarecimento dos eventos iniciais que ocorrem na interface osso/implante [45, 46]. Tais modelos propiciam a obtenção de informações morfológicas, bioquímicas e moleculares sobre a biologia de osteoblastos e a síntese de moléculas da matriz extracelular na interface com diferentes biomateriais, sem qualquer influência externa ou adicional [47].

1.6 Interface célula-material

As propriedades de superfície de um material determinam a resposta fisiológica de células que entram em contato com o material [48]. Assim, as características morfológicas e físico-químicas da superfície de um material de implante podem influenciar significativamente os resultados dos acontecimentos moleculares que ocorrem intracelularmente e na interface material-célula [30, 40, 48-54]. No caso de materiais de implantes ortopédicos, suas propriedades de superfície, como rugosidade, topografia e composição química influenciam na resposta celular inicial de osteoblastos. Estes, em última instância, afetam a qualidade e a estabilidade do tecido ósseo recém-formado ao redor do implante, determinando o seu desempenho [45, 48, 50-54].

A primeira fase da interação célula-material inclui o contato celular inicial e posterior adesão e disseminação de osteoblastos na superfície do material [30, 55]. A natureza destas interações iniciais e da resposta celular determina significativamente a proliferação e subsequente diferenciação das células. As

características qualitativas e quantitativas do contato inicial e a adesão das células à superfície do material são influenciadas pelas proteínas de adesão, que por sua vez podem ser reguladas pelas propriedades de superfície do material [30, 56-58]. O estudo de Anselme [59] descreve eventos de curta duração das forças iônicas, forças de van der Waal, e o papel, a longo prazo, das proteínas da matriz extracelular (MEC) e proteínas do citoesqueleto, que promovem a ação dos fatores de transcrição e expressão de genes específicos em células.

Embora não tenha sido claramente demonstrada, é provável que a interação de osteoblastos com a superfície do material é mediada por receptores de proteínas de adesão transmembrana, ou seja, as integrinas [57]. Estes receptores são proteínas de sinalização que são conhecidas por mediar a fixação de células a componentes específicos da MEC e os sinais gerados por eles são conhecidos por regular a proliferação e diferenciação celular [60, 61]. As integrinas trabalham em colaboração com as moléculas do citoesqueleto, como quinase de adesão focal (FAK), vinculina, paxilina e actina que fazem parte do complexo de adesão focal [26, 61-64].

1.7 Expressão gênica

O gene em si é tipicamente um longo trecho de DNA e não executa um papel ativo. Ele serve como um “molde” para a produção de RNA. A produção de cópias de RNA do DNA é chamada de transcrição, e é realizado pela RNA polimerase, que adiciona um nucleotídeo de RNA de cada vez a uma cadeia de RNA crescente. A produção das proteínas ocorre a partir da “leitura” deste RNA, chamada de tradução, como demonstrado na figura 3 [65]. O RNA transcrito é caracterizado como RNA mensageiro (mRNA) e outros tipos, tais como RNA interferência (iRNA), RNA ribossômico (rRNA) e RNA transportador (tRNA) [65].

Figura 3 – Esquematização da transcrição do DNA e tradução proteica [66].

Várias etapas no processo de expressão de genes podem ser moduladas, incluindo a transcrição, RNA “splicing”, tradução e modificação pós-traducional de uma proteína. A regulação do gene possibilita o controle de células sobre a estrutura e função, e é a base para a diferenciação celular, morfogênese, versatilidade e adaptabilidade de qualquer organismo [67]. Regulação do gene também pode servir como substrato para mudança evolutiva, já que o controle do tempo, da localização e da quantidade da expressão do gene pode ter um efeito profundo sobre as funções do gene em uma célula ou em um organismo multicelular [68].

Em genética, expressão de genes é o nível mais fundamental em que o genótipo dá origem ao fenótipo. O código genético é “interpretado” pela expressão do gene, e as propriedades dos produtos de expressão dão origem ao fenótipo do organismo. A transcrição e posterior tradução dos mRNAs das células caracterizam e quantificam as respostas celulares ao meio em que elas se encontram [67, 68]. Com isso, a quantificação de proteínas como moléculas de adesão celular, proteínas do MEC, proteínas de adesão focal, diferenciação celular, mineralização entre outros, é de essencial importância para a compreensão da interação dos osteoblastos com o nióbio puro.

1.7.1 Molécula de adesão celular (Integrina $\alpha 2$)

A interação inicial de células com o material envolve a sua fixação e espalhamento sobre a superfície do material. Sabe-se que as células não se ancoram diretamente nos materiais, mas interagem com um material por meio de uma interposta camada de proteínas. Estas proteínas são sintetizadas pelas células ou absorvidas do meio de cultura pelo material [30, 55, 69]. A matriz proteica age como um ligante para outras proteínas da família de receptores transmembrânicos das células, chamadas integrinas. As integrinas constituem em duas subunidades, sendo uma denominada alfa (α) e outra beta (β). Quinze subunidades α e oito subunidades β são descritas até os nossos dias, e estas se combinam para formar cerca de 20 receptores diferentes. O domínio extracelular e ambas as subunidades formam um sítio de união que interage entre si e forma os contatos focais das células [30, 57, 70].

As integrinas participam na transdução de sinais do meio ambiente para a célula, podendo regular as funções celulares, como o crescimento, diferenciação, migração, síntese de matriz extracelular, regulação gênica e até apoptose. Sendo assim, as variações de composição e organização da camada de proteínas podem induzir mudanças na resposta celular em relação ao material em que estão em contato ou o meio em que estão inseridos [57, 70-72].

O contato inicial de osteoblastos com superfícies de implantes via receptores específicos e integrinas é um evento que influencia, acima de tudo, na osteointegração dos implantes. Dentre as subunidades de integrina, a subunidade $\alpha 2$ é a mais importante [71, 72] e, devido a isso, escolhida para o nosso estudo através da expressão do gene *Itga2*.

A subunidade $\alpha 2$ é a principal ligante do colágeno, possuindo funções envolvidas na adesão celular, organização do citoesqueleto e controle da expressão gênica de colágeno e collagenase. Colágeno, por sua vez, é uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular de tecidos, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas e estruturais [71].

Esta interação inicial dos osteoblastos com a superfície do material de implante determina o resultado funcional do implante e a sua eficácia em longo prazo [30, 46,

48, 49]. Portanto, a superfície do material do implante desempenha um papel central na regulação do comportamento dos osteoblastos.

1.7.2 Proteínas da Matriz Extracelular (MEC) e moléculas indicadoras de reparo ósseo (Colágeno tipo I, Osteocalcina)

O tecido ósseo pode ser dividido em três componentes: matriz orgânica (osteóide), mineral e células. Grande parte do volume ósseo é o espaço extracelular preenchido por uma rede de macromoléculas formando a matriz extracelular. Estas são produzidas e secretadas pelas células e são constituídas por proteoglicanos (glicoproteínas), colágeno, proteínas estruturais, proteínas de adesão e proteínas elásticas [73]. A matriz extracelular localiza-se externamente à célula, no espaço intercelular, como demonstrado na figura 4. Possui funções como fornecer suporte mecânico para os tecidos, rápida difusão de nutrientes, regeneração dos tecidos, desenvolvimento, migração, forma e proliferação. No tecido ósseo a matriz extracelular é produzida pelos osteoblastos que participam efetivamente no remodelamento ósseo [73, 74].

Figura 4- Representação estrutural da MEC [75].

O colágeno tipo 1 representa mais de 90% do osteóide, sendo que o restante consiste em outras proteínas como a osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina e vitronectina. O colágeno pode desempenhar diversas funções no corpo humano como manter as células dos tecidos unidas, fortalecer a união entre células, cicatrização e/ou regeneração [76, 77].

A osteocalcina é a principal proteína não colágena presente no osso, sendo também conhecida como Bone Gla e BGP, produzida exclusivamente pelos osteoblastos durante o processo de síntese da matriz óssea. A produção de osteocalcina é um marcador do osteoblasto maduro. Sua função ou funções ainda são mal definidas, apesar de sua estrutura indicar interação com cálcio e com cristais de hidroxiapatita [78]. Adicionalmente, estudos indicam que o aparecimento e aumento de produção desta proteína são coincidentes com o início do processo de mineralização [79]. Outros estudos, *in vitro* e *in vivo*, sugerem que a osteocalcina tenha importante papel no recrutamento e diferenciação dos osteoclastos [80].

As células em contato com diferentes subprodutos pode alterar a produção de MEC e consequentemente alterar a função e sobrevivência celular. A expressão de colágeno tipo I e osteocalcina em contato com o material é de extrema importância para o início da biocompatibilidade, adesão celular e mineralização celular. Com isso, as expressões gênicas dos genes *Col1a* e *Bglap* foram escolhidas para o nosso estudo.

1.7.3 Marcador de sinalização celular - Proteína Citoplasmática Tirosina Kinase (FAK)

A mecanotransdução pode ser interpretada como um processo de reação bioquímica a partir de um estímulo mecânico. As reações bioquímicas induzidas pelo estímulo mecânico atuam em nível celular e podem causar inibição da apoptose, aumento da proliferação celular, alteração na migração celular, entre outros efeitos [81].

Quando um estímulo mecânico externo produz deformação do tecido ósseo, ocorre deformação circular e tensão de cisalhamento na membrana plasmática dos osteoblastos. Este estímulo é transmitido por toda a célula através de uma complexa rede que conecta a membrana plasmática ao núcleo da célula [81].

DNA, fará com que ocorra o prolongamento a partir deste primer. Isto fará com que ocorra uma extensão do DNA alvo e, conseqüentemente, a replicação do DNA.

Figura 6 – Anelamento dos primers no processo de reação de PCR [85].

Uma técnica molecular recente denominada Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), fornece dados quantitativos dos fragmentos de DNA [86]. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação a PCR que apresenta somente resultados qualitativos. O sistema é baseado no uso de corantes fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. Um corante bastante utilizado é a SYBR Green I, que se liga inespecificamente às fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. Trata-se de um corante que livre em solução não emite fluorescência, mas ligado a moléculas de DNA emite um forte sinal luminoso, conforme a figura 7. A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal, que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo do qPCR. A intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado [87]. O ciclo onde o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (Threshold) é denominado Ct e, o momento em que o Ct é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado [88]. Assim, denominando-se Ciclo Threshold ou Ct o ponto em que a emissão de fluorescência da amostra em teste supera a referência passiva do aparelho (background) [89], atingindo um platô onde cessa a amplificação, como demonstrado na figura 8. Desta forma, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantificação do produto amplificado, ou seja, é possível quantificar a expressão gênica de uma célula [87, 90, 91]. A análise dos resultados de um ensaio de qPCR é feita por meio dos gráficos gerados no computador interligado ao termociclador.

Figura 7 – Excitação fluorescente do SYBR Green I [92].

Figura 8– Curvas de monitoramento de fluorescência em qPCR. O limiar de detecção esta representado no traço horizontal azul. A fluorescência emitida antes do nível do CT para cada curva é considerada ruído de fundo (*background*) [93].

Com finalidade de quantificar a expressão gênica da célula se faz necessário uma reação de transcriptase reversa do RNA, ou seja, utilizar a proteína transcriptase reversa para construir um cDNA (DNA complementar) do RNA celular, permitindo subsequentemente uso no qPCR para quantificação. Essa técnica permite investigações não apenas de genes de baixa expressão, mas também de

espécimes de tamanho limitado. A quantidade de RNA produzido pelas células é proporcional à expressão gênica das células [87, 90].

2 Objetivo

Avaliar a biocompatibilidade e o potencial de osteointegração do elemento nióbio em contato direto com células osteoblásticas *in vitro*.

3 Justificativa

Faz-se necessário que um material de implante possua propriedades mecânicas, físicas, químicas e biológicas compatíveis para ser considerado um material para uso na fabricação de materiais de implante. A literatura especializada relata que o nióbio possui propriedades mecânicas, físicas e químicas que capacitam o emprego deste como materiais de implante. Ao que tange as propriedades biológicas de biocompatibilidade e osteointegração em conjunto, a literatura especializada pouco discute sobre o assunto. Visamos aqui analisar as propriedades biológicas de biocompatibilidade e osteointegração do elemento nióbio para propor seu uso como material de implante.

4 Material e Métodos

4.1 Material Nióbio

Nióbio de composição em porcentagem por peso de 97,47% Nb, 1,54% Si, 0,42% Eu, 0,29% Ho, 0,16% Re, 0,08% Ni e 0,03% Fe, foi fornecido pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM).

4.2 Preparação dos corpos de prova

O material nióbio foi confeccionado em formato cilíndrico (discos) através de operação de torno com as dimensões de 14 mm de diâmetro por 2 mm de altura. Subsequentemente, a superfície dos corpos de prova foi preparada utilizando a sequencia de lixas d'água de granulação 400, 600, 800, 1000 e 1200. Posteriormente limpos por ultrassom utilizando agua Mili-Q e autoclavados em temperatura de 125°C por 20 minutos.

4.3 Cultura celular *

A linhagem celular de células precursoras de osteoblastos de camundongos, MC3T3-E1, foi utilizada. A cultura celular foi suplementada com meio de cultura α -MEM (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) fornecida com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de Penicilina-Streptomicina (Gibco); mantida em estufas à 37°C com 5% de CO₂

* Nesta linhagem celular não se faz necessário a análise de comitê de ética.

4.4 Viabilidade celular

O procedimento para avaliar a viabilidade celular seguiu o protocolo experimental provido pela *Thermo Scientific* (Waltham, MA, USA), fabricante do Alamar Blue [94]. Células MC3T3-E1 foram cultivadas em placas de 24 poços de poliestireno, em concentração de 2×10^4 células por poço. Utilizamos dois grupos: Nb e Controle. No grupo Nb as células foram cultivadas em contato direto com o nióbio e no grupo controle foram cultivadas diretamente na placa de poliestireno.

A viabilidade celular foi analisada no 1º, 3º, 5º e 7º dia em cultura. Utilizamos o espectrômetro *Spectra MAX Gemini XS* da *Molecular Device* (Sunnyvale, CA, USA) com o programa *Softmaxpro* (*Molecular Device*) efetuando leituras de ondas de excitação 544 nm e emissão 590 nm.

Seguindo o protocolo, dilui-se o Alamar Blue em uma concentração de 1:9 em meio de cultura α -MEM. Adicionou-se 600 μ l desta solução por poço. Após a incubação de 4 h, retirou-se 200 μ l do sobrenadante, colocado em placas de 96 poços para análise por espectrometria.

4.5 Mineralização celular

Células osteoblásticas em concentração de 2×10^4 células por poço, em placas de 24 poços, foram cultivadas sobre a superfície do nióbio durante 21 dias, realizando troca do meio de cultura a cada dois dias. Posteriormente, a cultura foi fixada com uma solução de 2,5% glutaraldeído, durante 15 minutos na temperatura ambiente, e desidratada com álcool 70% no 1º, 7º, 14º e 21º dia para análise comparativa. Subsequentemente, foram coradas com Alizarin Red-S a 2%, com pH 4,2, em temperatura ambiente, por 15 minutos. Os pellets foram lavados com água destilada e deixados secar em temperatura ambiente, seguindo o protocolo experimental do Hongwei Cheng [95].

4.6 Extração do RNA

A extração total do RNA foi realizada utilizando o kit RNeasy Plus Micro da *Qiagen* (Valencia, CA, USA) conforme o protocolo do fornecedor [96]. A concentração e pureza do RNA total foram avaliadas por espectrometria utilizando o equipamento Nanodrop 2000 da *Thermo Scientific* (Waltham, MA, USA).

4.7 Confecção do cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 129ng de RNA total utilizando o kit *iScript cDNA Synthesis* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante [97]. Brevemente foram adicionados 129ng de RNA total e água nuclease-free até completar o volume de 15µl, 4µl de 5x *mix iScript* e 1µl de transcriptase reversa *iScript*. Posteriormente a solução foi incubada no termociclador T100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 25°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e resfriado a 4°C após a reação, em ordem sequencial. Subsequentemente o cDNA foi estocado em freezer a -20°C.

4.8 Primers

A sigla e identificação dos genes (ID) em estudo foram fornecidas pelo banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), conforme a tabela 3. Os primers utilizados para expressão gênica deste estudo foram adquiridos na Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) através dos seus respectivos ID.

Genes	Sigla dos genes	ID dos genes
Osteocalcina	Bglap	12096
FAK	Ptk2	14083
Colágeno I	Col1a	12842
Integrina $\alpha 2$	Itag2	16398
Proteína ribossomal S27A	Rps27a	78294

Tabela 2 – Siglas e ID dos genes selecionados para o estudo.

4.9 qPCR

A expressão gênica foi analisada em dois grupos: Nb e Controle; considerando que no grupo Nb as células foram cultivadas diretamente em contato com o nióbio e o grupo controle foi cultivado diretamente sobre a placa de poliestireno, ambos nos tempos de 4 horas, 1^o, 3^o, 5^o e 7^o dia.

Para este experimento utilizamos o kit *SsoFast EvaGreen* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante [98]. Brevemente, foi utilizado como padrão 2 µl de cDNA sintetizado para um volume final da reação de 10 µl contendo 400nM de cada primer e 5 µl de *SsoFast EvaGreen* supermix. Todas as amostras foram amplificadas em duplicata e cada grupo em triplicada. As reações no termociclador foram efetuadas com 40 ciclos em condições padrões recomendadas pelo fabricante: ativação enzimática - 95°C durante 30 s; desnaturação - 95°C durante 5 s; anelamento - 60°C durante 5 s. A avaliação do qPCR foi realizada no termociclador C1000 da Bio-Rad, localizada no laboratório LBBM - UFSCar.

Foi utilizado o gene RPS27a como normalizador. Todos os resultados da expressão gênica foram normalizados com o gene RPS27a, que possui expressão basal sempre igual em todas as circunstâncias, e comparados com o Controle nas mesmas condições de tempo. Consequentemente, os resultados do grupo Nb serão baseados em cima da expressão do grupo Controle em porcentagem, indicando os “folds” (x100).

4.6 Análise estatística

4.6.1 Viabilidade celular

O experimento de viabilidade celular (Alamar Blue) foi realizado em triplicata para os dois grupos: Nb e Controle; nos tempos de 4h, 1º, 3º, 5º e 7º dia. Todos os dados foram submetidos à análise de variância 1way ANOVA, utilizando o pós-teste Tukey [99]. Os gráficos foram plotados no software GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

4.6.2 qPCR

Para a análise quantitativa do qPCR utilizamos o método Livak, conforme o manual do Real-Time PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) [100]. Neste método as expressões dos genes são normalizadas com um gene constitutivo, aquele em que são expressos sempre, de forma que não necessita de regulação; utilizamos o gene RPS27a.

Os resultados foram submetidos à análise de variância 1way ANOVA com pós-teste Tukey e comprovados com Bonferroni [101]. Os gráficos foram plotados utilizando o software GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

5 Resultados e Discussão

5.1 Viabilidade celular

O Alamar Blue (ou resazurina) é um indicador redox colorimétrico e também fluorimétrico que fornece rápida quantificação de viabilidade celular em organismos vivos desde bactérias a células de mamíferos. Na reação de oxidação-redução do Alamar Blue existe uma correlação direta entre a sua redução em meio de crescimento celular e número de células vivas, como demonstrado nos estudos de O'Brien et al. [104].

A redução do Alamar Blue foi avaliada na presença e ausência do pellet de nióbio (Nb e Controle, respectivamente) durante o 1º, 3º, 5º e 7º dia em cultura. Os resultados são apresentados na figura 9. Observa-se que há um aumento expressivo da atividade celular durante os primeiros dias devido ao acelerado metabolismo celular, necessário para fixação, proliferação e sobrevivência celular. Subsequentemente, durante o 5º e 7º dia, a atividade celular estabilizou, demonstrando uma manutenção celular.

Figura 9 - Absorbância x dia; gráfico da viabilidade celular, realizada através da técnica Alamar Blue.

Considerando os resultados acima, há um aumento expressivo da atividade celular durante os primeiros dias devido ao acelerado metabolismo celular, necessário para: fixação, proliferação e sobrevivência celular. Subsequentemente, durante o 5º e 7º dia, a atividade celular ficou constante, demonstrando uma manutenção celular.

Com base nos resultados obtidos, a viabilidade celular comprovou que o nióbio é biocompatível, permitindo a sobrevivência e atividade metabólica celular em contato direto com sua superfície, não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos em nenhum dos tempos de avaliação. Na literatura há relatos de trabalhos que utilizaram o nióbio em forma de ligas e *in vivo*, que também demonstraram biocompatibilidade [32, 105-109]. No entanto, nosso estudo utilizou nióbio como produto bruto de fusão com 97,47% de pureza, tratando-se de um material proveniente diretamente da mineradora, sem qualquer tratamento químico ou físico.

5.2 Mineralização da matriz extracelular

A mineralização da matriz extracelular foi avaliada após 1º, 7º, 14º e 21º dias em cultura celular sobre os pellets de nióbio, através da coloração com vermelho de alizarina. Este corante permite a visualização dos nódulos de mineralização, uma vez que se liga seletivamente aos depósitos de cálcio, corando-os de vermelho escuro, como demonstrado nos estudos realizados por Chaudhary et al. (2004) [110]. Este experimento com alizarina permite visualizar se houve neoformação óssea na superfície do material.

Com base nas imagens obtidas através do equipamento estereomicroscópio, figura 10, pudemos analisar qualitativamente a presença da mineralização e a resposta celular em contato com a superfície do nióbio.

Figura 10 – Nódulos de mineralização em cultura celular realizada no 1º, 7º, 14º e 21º dias.

De acordo com as imagens obtidas, já no primeiro dia em cultura podemos notar que as células estavam aderidas ao material, e no decorrer do tempo houve um aumento na concentração de depósito de cálcio, comprovando as propriedades de osteocondução e osteogênese do material. A adesão celular se deve ao fato das células estarem produzindo integrinas e proteínas do MEC, como mencionado por Margolis et al e Fernandez-Yague et al [73, 74].

Pela coloração vermelha, principalmente no 7º, 14º e 21º dias, podemos visualizar a mineralização da matriz extracelular. Para que as células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1) possam mineralizar a matrix extracelular, elas precisam ser induzidas a células osteoblásticas maduras. Com isso, comprova-se que o nióbio possui potencial de ostioindução, uma vez que as células pré-osteoblásticas foram induzidas a células osteoblásticas maduras e, conseqüentemente, à formação de osso.

A associação dos resultados da viabilidade celular e mineralização celular comprovam que as células osteoblásticas em contato com a superfície do nióbio estão ativas, proliferando e mineralizando, ou seja, realizando neoformação óssea

na superfície do material. Conforme os estudos realizados *in vivo* em coelhos, por Johansson e Albrektsson [111], e em ratos, por Matsuno et. al. [32], comprovaram que o nióbio possui propriedades de osteocondução, osteogênese e osteoindução melhor que a do titânio cp. Os resultados em conjunto evidenciam que o material possui propriedades de osteointegração.

5.3 Expressão Gênica

5.3.1 Colágeno tipo I

O gene Col1a, responsável pela expressão do colágeno tipo I, possui atribuições importantíssimas na sobrevivência e suporte celular. A estabilidade e manutenção celular dependem da produção desta proteína [41, 76, 112-114].

Figura 11 – Dias x expressão gênica; Resultado da expressão gênica do gene Col1a; Para “*” = $p < 0,01$, “***” = $p < 0,001$ e “****” = $p < 0,0001$.

No resultado da expressão de Col1a, figura 11, há uma diferença estatística de $p < 0,0001$ na 4ª hora e 7º dia, e $p < 0,01$ no 3º e 1º dia em cultura, quando comparado com o controle.

O nióbio induziu um aumento substancial na expressão deste gene na 4ª hora e 7º dia em cultura, evidenciando que as células podem ter produzido mais colágeno tipo I, necessária para adesão, manutenção e espalhamento celular na superfície do material.

5.3.2 Integrina $\alpha 2$

O gene *Itga2*, responsável pela expressão das proteínas transmembranas integrinas $\alpha 2$, possui funções na adesão a colágeno e outras proteínas da MEC. Além disso, possui função ativa na transdução dos sinais do meio ambiente para dentro da célula [30, 57, 62, 115]. Para obtermos maiores informações sobre a relação entre a superfície do nióbio e o comportamento celular, se faz relevante a análise da expressão deste gene.

Figura 12 - Dias x expressão gênica; Resultado da expressão gênica do gene *Col1a*; Para "*" = $p < 0,01$, "***" = $p < 0,001$ e "****" = $p < 0,0001$.

Podemos notar no resultado, figura 12, a diferença estatística de $p < 0,0001$ no 3º e 7º dia, e $p < 0,01$ no 1º dia em cultura. Este gene já possui expressões baixas

quando comparado como os demais, possuindo valores de Ct altos, pelo fato de ser uma entre 15 subunidades de integrina.

O aumento na expressão deste gene pode estar associado ao aumento na produção de colágeno, consequentemente, aumentando a adesão, espalhamento e sinalização celular.

5.3.3 Proteína Citoplasmática Tirosina Kinase (FAK)

O gene Ptk2, responsável pela expressão da proteína citoplasmática tirosina kinase, possui funções na mecanotransdução e outras formas de transdução de sinais para o núcleo da célula [64, 82]. Sua necessidade celular é importante pelo fato de ser uma proteína que converge uma gama de sinais celulares responsáveis na manutenção, migração, sobrevivência, adesão, organização, progressão e apoptose celular. Sua ausência acarretaria em vários efeitos, podendo levar a morte celular [64, 82].

Figura 132 - Dias x expressão gênica; Resultado da expressão gênica do gene Col1a; Para “*” = $p < 0,01$, “***” = $p < 0,001$ e “****” = $p < 0,0001$.

Pela figura 13 podemos notar no gráfico uma diferença estatística de $p < 0,0001$ no 3º e 7º dia, e $p < 0,01$ no 5º dia quando comparados ao controle

Os aumentos no 3º e 7º dia podem estar relacionado ao aumento na expressão do colágeno tipo I e as proteínas transmembranas integrinas $\alpha 2$, visto que a FAK esta associada à sinalização celular de ambas indiretamente, como evidenciado por Sato et al e Castillo et al [81, 82].

No 5º dia houve uma diminuição na expressão, isso se deve provavelmente a baixa expressão de colágeno e integrina $\alpha 2$ da células neste tempo. Além disso, é esperada nas primeiras semanas uma regulação na expressão até atingir a estabilidade celular.

5.3.4 Osteocalcina

O gene Bglap é responsável pela expressão da proteína osteocalcina. Sua expressão é importante para o remodelamento ósseo, metabolismo celular, e possui afinidade com apatita, ou seja, esta intimamente relacionada ao crescimento e amadurecimento ósseo [79, 80].

Figura 314 - Dias x expressão gênica; Resultado da expressão gênica do gene Col1a; Para "*" = $p < 0,01$, "***" = $p < 0,001$ e "****" = $p < 0,0001$.

Podemos notar no resultado, figura 14, que houve uma diferença estatística de $p < 0,0001$ na 4ª hora e 7º dia em cultura, e $p < 0,01$ no 5º dia em cultura quando comparados com o controle.

Durante a 4ª hora e 7º dia houve um aumento significativo da expressão de Bglap. Pelo fato das primeiras horas serem as cruciais para a fixação celular, através da produção de MEC, acredita-se que este seja o motivo do aumento da expressão. Já no 7º dia, indica que houve uma produção e amadurecimento da matriz óssea madura, evidenciando a neoformação óssea comprovada no experimento do Alizarin Red. No 5º dia houve uma diminuição da expressão, porém como comentado anteriormente, trata-se da estabilidade celular, não evidenciando uma diferença estatística expressiva.

Para termos uma análise quantitativa da capacidade de osteocondução, osteoindução e osteogênese do material, foi necessário fazer o teste de qPCR. Através desta técnica, foi possível avaliar a expressão gênica de certo genes importantes para a adesão, sinalização, amadurecimento e mineralização celular. Este estudo permitiu ter uma evidência estatística da resposta celular em contato com o material. Para os genes em estudo houve, em média, um aumento da expressão gênica. Entretanto, é necessário ressaltar que nem toda expressão gênica pode levar em uma tradução proteica, visto que o RNA ainda pode passar por uma regulação pós-traducional, como apontado por Hardeland et al e Goldstein et al [67, 68]. Para isto seria necessária ainda uma análise imunoenzimática de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para poder quantificar as proteínas produzidas.

Pela análise do qPCR de todos os genes, ficou evidenciado que o material possui estatisticamente uma expressão gênica acima do controle durante o 7º dia em geral. Presume-se que deste dia em diante as células começam a produzir e manter o osso propriamente dito, pelo fato de nos primeiros dias as células ainda estarem sob influência da adesão e espalhamento celular.

Dentre os metais utilizados na área médica, como Aço Inoxidável F 138, Aço Inoxidável ISO 5832-9 e ligas de titânio, o nióbio possui propriedades físicas desejadas para aplicações médicas, conforme ilustrado na tabela 2. Estudo realizado por Niinomi (2008) [102], entre as propriedades físicas, o controle de

módulo de Young, em particular, tem sido amplamente investigada porque o muito mais elevado módulo de Young de biomateriais metálicos em comparação com osso, pode levar à atrofia óssea e pobre remodelação óssea, embora os implantes precisem rigidez estrutural [103]. Para que o nióbio possa ser utilizado em aplicações médicas, foi necessário um estudo das propriedades de biocompatibilidade, mineralização e integração óssea.

O aço inoxidável F-138 é o metal mais utilizado mundialmente como material de implante. Em comparação com o Nb, dentre as propriedades requeridas para um material de implante, destaca-se, como característica mecânica, limite de escoamento, microdureza e densidade (tabela 2). Notoriamente o nióbio possui um limite de escoamento maior que o aço inoxidável F-138. Temos com o elemento Nb um regime elástico maior [6, 7]. Como característica física, analisando os valores do aço inoxidável F-138 observamos que o Nb possui módulo de elasticidade 105GPa, praticamente o dobro do valor do aço inoxidável F-138. Também, tanto o Nb como o aço inox, são paramagnéticos [6, 7]. Sob o aspecto de características químicas, o Nb possui resistência à corrosão semelhante ao do aço inoxidável F-138 [116, 117] e relativo a características biológicas, tanto o aço inoxidável F-138 como o Nb, são metais biocompatíveis. Porém, somente o Nb é osteointegrador.

6 Conclusão

Diante dos resultados obtidos no experimento *invitro*, pode-se afirmar que o nióbio produto bruto de fusão com pureza de 97,47% apresentou biocompatibilidade e potencial de osteointegração quando em contato com células precursoras de osteoblastos.

7 Sugestão de estudos

O nióbio em estudo precisa ser melhor analisado *invivo* para que possa ser utilizado como um material de síntese.

Referência Bibliográfica **

1. Harry Stuart, K.H., Pascoal Bordignon, Solon Y. Tagusagawa, Tadeu Carneiro. *USOS E USUÁRIOS FINAIS DE NIÓBIO*. 1999; Available from: <http://www.cbmm.com.br/br/p/173/usos-e-usuarios-finais-de-niobio.aspx>.
2. Alvarenga, D. *Monopólio brasileiro do nióbio gera cobiça mundial, controvérsia e mitos*. 2013; Available from: <http://g1.globo.com/economia/negocios/noticia/2013/04/monopolio-brasileiro-do-niobio-gera-cobica-mundial-controversia-e-mitos.html>
3. Quimlab. 2015; Available from: <http://www.quimlab.com.br/guidadoselementos/niobio.htm>.
4. Bewlay, B.P., M.R. Jackson, and H.A. Lipsitt, *The balance of mechanical and environmental properties of a multielement niobium-niobium silicide-based In Situ composite*. Metallurgical and Materials Transactions A, 1996. **27**(12): p. 3801-3808.
5. Ufuktepe, Y., et al., *Structural, electronic, and mechanical properties of niobium nitride prepared by thermal diffusion in nitrogen*. Materials Chemistry and Physics, 2013. **141**(1): p. 393-400.
6. Callister, W.D., *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*. 5a edição ed. 2008, Rio de Janeiro: LTC.
7. Giordani, E.J., I. Ferreira, and O. Balancin, *Propriedades mecânicas e de corrosão de dois aços inoxidáveis austeníticos utilizados na fabricação de implantes ortopédicos*. Rem: Revista Escola de Minas, 2007. **60**: p. 55-62.
8. Roy, S., et al., *Pore Geometry Optimization of Titanium (Ti6Al4V) Alloy, for Its Application in the Fabrication of Customized Hip Implants*. Int J Biomater, 2014. **2014**: p. 313975.
9. Farrar, G., et al., *Gallium (aluminium) transferrin binding in Alzheimer's disease*. Lancet, 1992. **339**(8788): p. 302-3.
10. Joep, R.S. and G.V. Johnson, *Neurotoxic effects of dietary aluminium*. Ciba Found Symp, 1992. **169**: p. 254-62; discussion 262-7.
11. McLachlan, D.R., P.E. Fraser, and A.J. Dalton, *Aluminium and the pathogenesis of Alzheimer's disease: a summary of evidence*. Ciba Found Symp, 1992. **169**: p. 87-98; discussion 99-108.
12. Winship, K.A., *Toxicity of aluminium: a historical review, Part 2*. Adverse Drug React Toxicol Rev, 1993. **12**(3): p. 177-211.
13. Winship, K.A., *Toxicity of aluminium: a historical review, Part 1*. Adverse Drug React Toxicol Rev, 1992. **11**(2): p. 123-41.
14. Yumoto, S., et al., *Aluminium incorporation into the brain of rat fetuses and sucklings*. Brain Res Bull, 2001. **55**(2): p. 229-34.
15. Wang, X., et al., *Porous TiNbZr alloy scaffolds for biomedical applications*. Acta Biomater, 2009. **5**(9): p. 3616-24.
16. Semlitsch, M., et al., *[Joint prostheses components of warm-forged and surface treated Ti-6Al-7Nb alloy]*. Biomed Tech (Berl), 1991. **36**(5): p. 112-9.
17. Semlitsch, M.F., et al., *Joint replacement components made of hot-forged and surface-treated Ti-6Al-7Nb alloy*. Biomaterials, 1992. **13**(11): p. 781-8.
18. Doi, H., et al., *Fatigue Property of Ti-5Al-13Ta Alloy Dental Castings in 0.9% NaCl Solution*. MATERIALS TRANSACTIONS, 2006. **47**(9): p. 2444-2447.

19. Majumdar, P., et al., *Corrosion behaviour of heat treated boron free and boron containing Ti-13Zr-13Nb (wt%) alloy in simulated body fluid*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(4): p. 797-807.
20. Majumdar, P., et al., *Influence of boron addition to Ti-13Zr-13Nb alloy on MG63 osteoblast cell viability and protein adsorption*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **46**: p. 62-8.
21. Schmalz, G., *Materials science: biological aspects*. J Dent Res, 2002. **81**(10): p. 660-3.
22. Schmalz, G. and P. Garhammer, *Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues*. Dent Mater, 2002. **18**(5): p. 396-406.
23. Semlitsch, M., F. Staub, and H. Weber, *Titanium-aluminium-niobium alloy, development for biocompatible, high strength surgical implants*. Biomed Tech (Berl), 1985. **30**(12): p. 334-9.
24. Semlitsch, M., H. Weber, and R. Steger, *[15 years experience with the Ti-6Al-7Nb alloy for joint prostheses]*. Biomed Tech (Berl), 1995. **40**(12): p. 347-55.
25. Anusavice, K.J., *Standardizing failure, success, and survival decisions in clinical studies of ceramic and metal-ceramic fixed dental prostheses*. Dent Mater, 2012. **28**(1): p. 102-11.
26. Henrich, D., et al., *Characterization of bone marrow mononuclear cells on biomaterials for bone tissue engineering in vitro*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 762407.
27. Murray, P.E., C. Garcia Godoy, and F. Garcia Godoy, *How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated?* Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2007. **12**(3): p. E258-66.
28. Teodor, E., et al., *Nanostructured Biomaterials with Controlled Properties Synthesis and Characterization*. Nanoscale Res Lett, 2009. **4**(6): p. 544-549.
29. Bombonato-Prado, K.F., et al., *Microarray-based gene expression analysis of human osteoblasts in response to different biomaterials*. J Biomed Mater Res A, 2009. **88**(2): p. 401-8.
30. Anselme, K., *Osteoblast adhesion on biomaterials*. Biomaterials, 2000. **21**(7): p. 667-81.
31. Brunski, J.B., D.A. Puleo, and A. Nanci, *Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2000. **15**(1): p. 15-46.
32. Matsuno, H., et al., *Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium*. Biomaterials, 2001. **22**(11): p. 1253-62.
33. Bonnier, F., et al., *Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models*. Toxicol In Vitro, 2015. **29**(1): p. 124-31.
34. Nakayama, G.R., et al., *Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro*. J Immunol Methods, 1997. **204**(2): p. 205-8.
35. Springer, J.C., et al., *In vitro dermal and epidermal cellular response to titanium alloy implants fabricated with electron beam melting*. Med Eng Phys, 2014. **36**(10): p. 1367-72.
36. Bioutil. *Alamar Blue*. 2013; Available from: <http://www.bioutil.com/product/vita-blue-cell-viability-reagent.html>.
37. Gleizal, A.M. and J.L. Beziat, *Maxillary and mandibular reconstruction using bicortical calvarial bone grafts: a retrospective study of 122 reconstructions in 73 patients*. Plast Reconstr Surg, 2007. **119**(2): p. 542-8; discussion 549-50.

38. Carvalho, D.C., et al., *[Non-pharmacological treatments in the stimulation of osteogenesis]*. Rev Saude Publica, 2002. **36**(5): p. 647-54.
39. Garcia-Gareta, E., M.J. Coathup, and G.W. Blunn, *Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration*. Bone, 2015. **81**: p. 112-121.
40. Albrektsson, T. and C. Johansson, *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration*. Eur Spine J, 2001. **10 Suppl 2**: p. S96-101.
41. Cornell, C.N. and J.M. Lane, *Current understanding of osteoconduction in bone regeneration*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S267-73.
42. Gregory, C.A., et al., *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. Anal Biochem, 2004. **329**(1): p. 77-84.
43. Ibsen, C.J. and H. Birkedal, *Modification of bone-like apatite nanoparticle size and growth kinetics by alizarin red S*. Nanoscale, 2010. **2**(11): p. 2478-86.
44. Vico, L., M.H. Lafage-Proust, and C. Alexandre, *Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in vivo*. Bone, 1998. **22**(5 Suppl): p. 95S-100S.
45. Brunski, J.B., *In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface*. Adv Dent Res, 1999. **13**: p. 99-119.
46. Muster, D. and M. Champy, *[Problem of bone-biomaterial interface]*. Actual Odontostomatol (Paris), 1978(121): p. 109-24.
47. Rosa, A.L. and M.M. Beloti, *TAK-778 enhances osteoblast differentiation of human bone marrow cells cultured on titanium*. Biomaterials, 2003. **24**(17): p. 2927-32.
48. Boyan, B.D., et al., *Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response*. Biomaterials, 1996. **17**(2): p. 137-46.
49. Bowers, K.T., et al., *Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1992. **7**(3): p. 302-10.
50. Lim, J.Y., et al., *Surface energy effects on osteoblast spatial growth and mineralization*. Biomaterials, 2008. **29**(12): p. 1776-84.
51. Lincks, J., et al., *Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition*. Biomaterials, 1998. **19**(23): p. 2219-32.
52. Linez-Bataillon, P., et al., *In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates*. Biomol Eng, 2002. **19**(2-6): p. 133-41.
53. Martin, J.Y., et al., *Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)*. J Biomed Mater Res, 1995. **29**(3): p. 389-401.
54. Sader, M.S., et al., *Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation*. Clin Oral Implants Res, 2005. **16**(6): p. 667-75.
55. Grinnell, F., *Cellular adhesiveness and extracellular substrata*. Int Rev Cytol, 1978. **53**: p. 65-144.
56. Allen, L.T., et al., *Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction*. Biomaterials, 2006. **27**(16): p. 3096-108.
57. Clarke, S.A. and P.A. Revell, *Integrin expression at the bone/biomaterial interface*. J Biomed Mater Res, 2001. **57**(1): p. 84-91.

58. dos Santos, E.A., et al., *Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior*. J Biomed Mater Res A, 2009. **89**(2): p. 510-20.
59. Anselme, K., *Biomaterials and interface with bone*. Osteoporos Int, 2011. **22**(6): p. 2037-42.
60. Geiger, B., et al., *Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 793-805.
61. Sastry, S.K. and K. Burridge, *Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics*. Exp Cell Res, 2000. **261**(1): p. 25-36.
62. Gilbert, H.T., et al., *Integrin - dependent mechanotransduction in mechanically stimulated human annulus fibrosus cells: evidence for an alternative mechanotransduction pathway operating with degeneration*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e72994.
63. Huang, X., et al., *Enhanced integrin-mediated human osteoblastic adhesion to porous amorphous calcium phosphate/poly (L-lactic acid) composite*. Chin Med J (Engl), 2014. **127**(19): p. 3443-8.
64. Leucht, P., et al., *FAK-Mediated mechanotransduction in skeletal regeneration*. PLoS One, 2007. **2**(4): p. e390.
65. Weeks, K.M., *Review toward all RNA structures, concisely*. Biopolymers, 2015. **103**(8): p. 438-48.
66. BioGeo. 2010; Available from: <http://biologia-geologia11a.blogspot.com.br/2010/10/sintese-de-proteinas.html>.
67. Hardeland, R., *Melatonin, noncoding RNAs, messenger RNA stability and epigenetics--evidence, hints, gaps and perspectives*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(10): p. 18221-52.
68. Goldstein, S. and R.J. Shmookler Reis, *Genetic modifications during cellular aging*. Mol Cell Biochem, 1984. **64**(1): p. 15-30.
69. Walters, N.J. and E. Gentleman, *Evolving insights in cell-matrix interactions: elucidating how non-soluble properties of the extracellular niche direct stem cell fate*. Acta Biomater, 2015. **11**: p. 3-16.
70. Hohenester, E., *Signalling complexes at the cell-matrix interface*. Curr Opin Struct Biol, 2014. **29**: p. 10-6.
71. Lai, M., et al., *Role of alpha2beta1 integrins in mediating cell shape on microtextured titanium surfaces*. J Biomed Mater Res A, 2015. **103**(2): p. 564-73.
72. Wang, X., et al., *Role of integrin alpha2 beta1 in mediating osteoblastic differentiation on three-dimensional titanium scaffolds with submicron-scale texture*. J Biomed Mater Res A, 2015. **103**(6): p. 1907-18.
73. Margolis, H.C., S.Y. Kwak, and H. Yamazaki, *Role of mineralization inhibitors in the regulation of hard tissue biomineralization: relevance to initial enamel formation and maturation*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 339.
74. Fernandez-Yague, M.A., et al., *Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomachanical strategies*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **84**: p. 1-29.
75. Fernandez, D. *Matriz Extracelular*. 2014; Available from: <http://aprendiendohistologia.blogspot.com.br/2014/03/matriz-extracelular-la-matriz.html>.
76. Alliston, T., *Biological regulation of bone quality*. Curr Osteoporos Rep, 2014. **12**(3): p. 366-75.

77. Smith, E.L., et al., *Evaluation of skeletal tissue repair, part 2: enhancement of skeletal tissue repair through dual-growth-factor-releasing hydrogels within an ex vivo chick femur defect model*. Acta Biomater, 2014. **10**(10): p. 4197-205.
78. Hendesi, H., et al., *Integrin mediated adhesion of osteoblasts to connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) induces cytoskeleton reorganization and cell differentiation*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0115325.
79. Chenu, C., et al., *Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells*. J Cell Biol, 1994. **127**(4): p. 1149-58.
80. Glowacki, J., et al., *A role for osteocalcin in osteoclast differentiation*. J Cell Biochem, 1991. **45**(3): p. 292-302.
81. Sato, N., et al., *Osteoblast mechanoresponses on Ti with different surface topographies*. J Dent Res, 2009. **88**(9): p. 812-6.
82. Castillo, A.B., et al., *Focal adhesion kinase plays a role in osteoblast mechanotransduction in vitro but does not affect load-induced bone formation in vivo*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e43291.
83. Gusmão, C.V.B.d. and W.D. Belangero, *Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico?* Revista Brasileira de Ortopedia, 2009. **44**: p. 299-305.
84. Yang, S. and R.E. Rothman, *PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings*. Lancet Infect Dis, 2004. **4**(6): p. 337-48.
85. Cartografiabiológica. *PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase*. 2011; Available from: <http://cartografiabiologica.blogspot.com.br/2011/06/pcr-reacao-em-cadeia-pela-polimerase.html>.
86. Mestdagh, P., et al., *A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization*. Genome Biol, 2009. **10**(6): p. R64.
87. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
88. Mortarino, M., et al., *[Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania]*. Parassitologia, 2004. **46**(1-2): p. 163-7.
89. FLEURY, I. *PCR quantitativo em tempo real (Real-Time PCR)*. Manual Fleury de Diagnóstico em Hematologia 2004; Available from: www.institutofleury.org.br/educacao/manuais/manual_hemato/capitulo3b_impressa.
90. Deepak, S., et al., *Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes*. Curr Genomics, 2007. **8**(4): p. 234-51.
91. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. Biotechniques, 2008. **44**(5): p. 619-26.
92. Bio-Rad. *PCR Primer and Probe Chemistries*. 2015; Available from: <http://www.bio-rad.com/pt-br/applications-technologies/pcr-primer-probe-chemistries>.
93. FLEURY, I., *PCR quantitativo em tempo real (real-time PCR)*. 2012.
94. Scientific, T.F. *AlamarBlue® Cell Viability Assay Protocol*. 2008; Available from: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/cell-proliferation-assay-protocols/cell-viability-with-alamarblue.html>.
95. Cheng, H. *Alizarin Red S Staining for Calcium Precipitation (Mineralization)*. 2001; Available from: <http://www.boneandcancer.org/protocolsf3.htm>.

96. Quiagen. *RNeasy Plus Micro Handbook*. 2008; Available from: <https://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=59b921cd-b65f-42d5-9a0b-1da673d7c01b&lang=en>.
97. Bio-Rad, *iScript™ cDNA Synthesis Kit*. 2015.
98. Bio-Rad. *SsoFast™ EvaGreen® Supermixes* 2015; Available from: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_10014647.pdf.
99. Camilleri, J., *The biocompatibility of modified experimental Portland cements with potential for use in dentistry*. Int Endod J, 2008. **41**(12): p. 1107-14.
100. Bio-Rad. *Real-Time PCR Applications Guide*. 2006; Available from: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>.
101. Yuan, Z., et al., *Effect of bioaggregate on mineral-associated gene expression in osteoblast cells*. J Endod, 2010. **36**(7): p. 1145-8.
102. Niinomi, M., *Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications*. J Mech Behav Biomed Mater, 2008. **1**(1): p. 30-42.
103. Niinomi, M., M. Nakai, and J. Hieda, *Development of new metallic alloys for biomedical applications*. Acta Biomater, 2012. **8**(11): p. 3888-903.
104. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem, 2000. **267**(17): p. 5421-6.
105. Bertrand, E., et al., *Synthesis and characterisation of a new superelastic Ti-25Ta-25Nb biomedical alloy*. J Mech Behav Biomed Mater, 2010. **3**(8): p. 559-64.
106. Breme, J. and V. Wadewitz, *Comparison of titanium-tantalum and titanium-niobium alloys for application as dental implants*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1989. **4**(2): p. 113-8.
107. Chang, T.J., M.B. Werd, and C. Hovelsen, *Metallic implants used in foot surgery*. Clin Podiatr Med Surg, 1995. **12**(3): p. 457-74.
108. de Andrade, D.P., et al., *Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **56**: p. 538-44.
109. Dsouki, N.A., et al., *Cytotoxic, hematologic and histologic effects of niobium pentoxide in Swiss mice*. J Mater Sci Mater Med, 2014. **25**(5): p. 1301-5.
110. Chaudhary, L.R., A.M. Hofmeister, and K.A. Hruska, *Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation*. Bone, 2004. **34**(3): p. 402-11.
111. Johansson, C.B. and T. Albrektsson, *A removal torque and histomorphometric study of commercially pure niobium and titanium implants in rabbit bone*. Clin Oral Implants Res, 1991. **2**(1): p. 24-9.
112. Fratzl-Zelman, N., et al., *Matrix mineralization in MC3T3-E1 cell cultures initiated by beta-glycerophosphate pulse*. Bone, 1998. **23**(6): p. 511-20.
113. Hirata, E., et al., *Development of a 3D collagen scaffold coated with multiwalled carbon nanotubes*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **90**(2): p. 629-34.
114. Perrier, A., et al., *Apatite content of collagen materials dose-dependently increases pre-osteoblastic cell deposition of a cement line-like matrix*. Bone, 2010. **47**(1): p. 23-33.
115. Comisar, W.A., D.J. Mooney, and J.J. Linderman, *Integrin organization: linking adhesion ligand nanopatterns with altered cell responses*. J Theor Biol, 2011. **274**(1): p. 120-30.

116. Cundy, T.P., et al., *Serum titanium, niobium and aluminium levels two years following instrumented spinal fusion in children: does implant surface area predict serum metal ion levels?* Eur Spine J, 2014. **23**(11): p. 2393-2400.
117. Harding, A.F., et al., *A clinical and metallurgical analysis of retrieved Jewett and Richards hip plate devices.* Clin Orthop Relat Res, 1985(195): p. 261-9.