



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE CTBMF E PERIODONTIA

GABRIEL LUCIO CALAZANS DUARTE

**Diferenciação osteogênica e macrofágica *in vitro* sobre  
nanotopografia de titânio funcionalizada com polifenóis de extrato  
de bagaço de uva**

Ribeirão Preto/SP

2022

GABRIEL LUCIO CALAZANS DUARTE

**Diferenciação osteogênica e macrofágica *in vitro* sobre  
nanotopografia de titânio funcionalizada com polifenóis de extrato  
de bagaço de uva**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

Orientador: Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira

Ribeirão Preto/SP

2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

Duarte, Gabriel Lucio Calazans

Diferenciação osteogênica e macrofágica *in vitro* sobre nanotopografia de titânio funcionalizada com polifenóis de extrato de bagaço de uva

Ribeirão Preto – São Paulo, 2022.

**50p.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Paulo Tambasco de Oliveira

1. Liga de titânio; 2. Nanotopografia; 3. Funcionalização de superfície;
4. Polifenóis; 5. Osteoblastos; 6. Macrófagos

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Duarte, Gabriel Lucio Calazans

**Diferenciação osteogênica e macrofágica *in vitro* sobre  
nanotopografia de titânio funcionalizada com polifenóis de extrato  
de bagaço de uva**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2022

**Banca Examinadora**

Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino e guia. Aos meus pais e minha irmã, por estarem comigo em todos os momentos de minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela força e coragem durante toda esta caminhada.

Aos meus pais, Ricardo e Lígia Duarte, por serem tão presentes mesmo nos momentos de maior distância em todo esse tempo que estive aqui em São Paulo desde 2016. Vocês são minha inspiração e minha força. Obrigado por todo esforço de vocês para me tornar quem eu sou.

A minha irmã, Gabriella Duarte, por ter dividido comigo o tempo dela aqui em Ribeirão Preto/SP. Por sempre me apoiar em todas as minhas decisões e ser minha parceira em todas elas. Obrigado, irmãzinha.

A minha parceira de vida, Rafaella Scannavino, por todo apoio, ajuda, amor e companheirismo dedicado a mim por todo esse tempo. Obrigado por me doar todo o seu sentimento para meus dias ficarem mais leves.

À minha família paulista, meu sogro Ricardo, minha sogra Maria Luiza, meus cunhados e irmão Ricardo Henrique e Vitor Hugo, por sempre estarem comigo nessa caminhada, por me apoiarem, por me darem atenção, e me fazerem sentir em casa na casa de vocês. Muito obrigado!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, por toda a orientação e conhecimentos transmitidos nesse período, com certeza será sempre lembrado.

A minhas tias postças Marli, Márcia e Maraiza, por me apoiarem nessa vida que levo de trabalho e estudo fazendo da casa delas minha casa com muito amor e atenção.

Ao grupo de pesquisa do Politécnico de Torino, que me recebeu com muito profissionalismo e acolhimento em Turim/IT. Em especial, professora Silvia Spriano e sua equipe, em nome de Sarah Ferraris e Giacomo Riccucci, pela orientação e parceria neste trabalho.

Aos meus amigos de mestrado: José Henrique, Lucas Nogueira e Beatriz Kubata, Michael Medeiros e família, pelo companheirismo, amizade e incentivo.

Aos meus amigos de Natal, que sempre me apoiaram mesmo na distância, a amizade de vocês é muito importante para mim.

À Maria Isabel Gobbo Simonetti, pessoa mais que especial, que por todo esse tempo foi paciente e amiga em todos os momentos dentro da Universidade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP- USP e do Laboratório de Cultura de Células, por toda ajuda durante o período de pós-graduação.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À FAPESP, pelo auxílio à pesquisa regular ao meu orientador (processo 2016/50298-4).



## RESUMO

A funcionalização de superfícies nanoestruturadas de implantes metálicos com moléculas orgânicas vem se destacando como estratégia importante para o controle de eventos biológicos que ocorrem na região interfacial durante o reparo ósseo. O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, aspectos-chaves da interação de células das linhagens osteoblástica e macrofágica com superfície de liga de titânio com nanotopografia rica em grupos hidroxila (Ti Nano), funcionalizada com polifenóis de extrato de bagaço de uva na concentração de 5 mg/mL (PPHE). Cultura de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 foram avaliadas em relação a morfologia e viabilidade celulares, atividade *in situ* da enzima fosfatase alcalina e detecção de acúmulos de cálcio/formação de matriz mineralizada, enquanto que a de células macrofágicas RAW 264.7, avaliadas em relação a morfologia e viabilidade celulares e expressão de marcadores macrofágicos por *Real Time PCR*. A nanotopografia de Ti6Al4V foi obtida por meio de processo patenteado que inclui condicionamento químico de solução de ácido fluorídrico e oxidação controlada com peróxido de hidrogênio. Os resultados mostraram que sobre Ti Nano+PPHE, células MC3T3-E1 exibem tendência a menor espreadimento celular e maior viabilidade em períodos iniciais da cultura – 3 e 7 dias –, com potencial osteogênico expressivo e crescente de 14 a 18 dias, estatisticamente semelhante ao de culturas sobre Ti Nano em 18 dias. Culturas RAW 264.7 exibem células aderidas e espreadas sobre Ti Nano e Ti Nano+PPHE em 3 dias, com aspectos semelhantes entre si de variabilidade morfológica e de viabilidade celular, e com maior expressão de *iNOS*, *Arg1*, *TNF- $\alpha$*  e *GM-CSF* sobre Ti Nano+PPHE em 5 dias. Em conclusão, a funcionalização de PPHE sobre nanotopografia de Ti exerce efeitos biológicos sobre células osteoblásticas e macrofágicas *in vitro* potencialmente moduladores do processo de reparo ósseo na interface com implantes metálicos osseointegráveis.

**Palavras-chaves:** liga de titânio, nanotopografia, funcionalização de superfície, polifenóis, osteoblastos, macrófagos.

## ABSTRACT

The functionalization of nanostructured surfaces of metallic implants with organic molecules has been highlighted as an important strategy for the control of biological events that occur in the interfacial region during bone repair. The aim of the present study was to evaluate, *in vitro*, key aspects of the interaction of osteoblastic and macrophagic cells with a nanostructured titanium alloy surface rich in hydroxyl groups (Ti Nano), functionalized with polyphenols from grape pomace extract at the concentration of 5 mg/mL (PPHE). Pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells were evaluated in terms of cell morphology and cell viability, *in situ* alkaline phosphatase activity and mineralized matrix formation, whereas the macrophagic RAW 264.7 cell line were evaluated in terms of cell morphology and cell viability, and expression of macrophage markers by Real Time PCR. The Ti6Al4V nanotopography was obtained by means of a patented process consisting of chemical etching with hydrofluoric acid solution and controlled oxidation with hydrogen peroxide. The results showed that on Ti Nano+PPHE, MC3T3-E1 cells show a tendency towards reduced cell spreading and significantly higher cell viability at days 3 and 7 of culture, with increasing osteogenic potential from 14 to 18 days of culture, similarly to that of cultures on Ti Nano at day 18 of culture. RAW 264.7 cells attached and spread on Ti Nano and Ti Nano+PPHE, exhibiting similar aspects of morphological variability and unaltered cell viability at day 3 of culture, and higher mRNA expression of *iNOS*, *Arg1*, *TNF- $\alpha$*  and *GM-CSF* on Ti Nano+PPHE at day 5 of culture. In conclusion, the functionalization of PPHE on Ti Nano exerts biological effects on both osteoblastic and macrophagic cells *in vitro* that potentially modulate the bone repair process at the interface with osseointegrated metallic implants.

**Keywords:** titanium alloy, nanotopography, surface functionalization, polyphenols, osteoblasts, macrophages.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Epifluorescência de culturas de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti Nano (A e C) e Ti Nano+PPHE (B e D) em 3 dias. Fluorescência verde revela o citoesqueleto de actina e a azul, núcleos celulares. Note-se em Ti Nano+PPHE (B e D), tendência a espraio menor das células.

**Figura 2:** Viabilidade celular em densidade óptica, por ensaio de CellTiter-Blue, nos dias 3, 7 e 12 de culturas de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti Nano e Ti Nano+PPHE. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ). Em 3 e 7 dias, a viabilidade celular é maior em culturas crescidas sobre Ti Nano+PPHE.

**Figura 3:** Imagens macroscópicas de atividade de ALP *in situ* pelo método do Fast Red em 12 dias de culturas de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Nano e Ti Nano+PPHE. Note-se distribuição homogênea de coloração vermelha por toda a extensão das culturas sobre as duas superfícies. Barra de escala = 2,2 mm.

**Figura 4:** Imagens macroscópicas e quantificação da mineralização por coloração com vermelho de Alizarina, que detecta depósitos de cálcio, de culturas de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti Nano e Ti Nano+PPHE, em 14 e 18 dias. Macroscopicamente, as culturas MC3T3-E1 se apresentavam coradas por toda a extensão das superfícies dos discos – 10 mm de diâmetro – nos dois grupos, com áreas de aspectos puntiformes com maior intensidade de vermelho. A extração bioquímica do corante revelou maiores valores de mineralização para culturas sobre Ti Nano em comparação a Ti Nano+PPHE em 14 dias, mas estatisticamente iguais em 18 dias. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ).

**Figura 5:** Epifluorescência de culturas de células macrofágicas RAW 264.7 crescidas sobre superfícies de Ti Nano (A e C) e Ti Nano+PPHE (B e D) em 3 dias. Fluorescência verde revela o citoesqueleto de actina e a azul, núcleos celulares. Notem-se sobre as duas superfícies células com aspectos morfológicos esféricos, com espraio multidirecional ou fusiformes, exibindo longas extensões citoplasmáticas bidirecionais.

**Figura 6:** Viabilidade celular em densidade óptica, por ensaio de CellTiter-Blue, de culturas de células macrofágicas RAW 264.7 crescidas sobre superfícies de Ti Nano e Ti Nano+PPHE em 3 dias. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ). A viabilidade celular manteve-se semelhante sobre as duas superfícies.

**Figura 7:** Expressão relativa de RNA mensageiro para *iNOS* (A), *Arg1* (B), *TNF- $\alpha$*  (C), *GM-CSF* (D), *NRF2* (E) e *IL-1 $\beta$*  (F) de células RAW 264.7 crescidas sobre Ti Nano e Ti Nano+PPHE, em 5 dias. Os dados foram normalizados por

GAPDH e o valor 1, atribuído ao Ti Nano. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ).

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

$\mu\text{L}$  - microlitro

$\mu\text{m}$  - micrometro

ALP - fosfatase alcalina

ARS - vermelho de Alizarina S

$\text{Ca}^{+2}$  - íon cálcio

$\text{CaCl}_2$  - cloreto de cálcio

cDNA - DNA complementar

$\text{cm}^2$  - centímetro quadrado

$\text{CO}_2$  - gás carbônico

DEPC - água tratada com dietil pirocarbonato

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

g - grama

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h - hora

$\text{H}_2\text{O}_2$  - peróxido de hidrogênio

$\text{H}_2\text{SO}_4$  - ácido sulfúrico

HCl - ácido clorídrico

L - litro

M - molar

mg - miligrama

mg/kg - miligrama por quilograma

mg/mL - miligrama por mililitro

min - minuto

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

ng/mL - nanograma por mililitro

nm - nanometro

NO - óxido nítrico

°C - grau Celsius

PB - tampão fosfato

PBS - tampão fosfato salina

PCR - reação em cadeia da polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> - íon fosfato

PPHE - polifenóis

RIN - número de integridade do RNA

RNA - ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub> - ácido ribonucleico mensageiro

s - segundo

T.A. - temperatura ambiente

Ti Nano - titânio com nanotopografia

Ti Nano+PPHE - titânio funcionalizado com polifenóis

Ti - titânio

TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano

UV - ultravioleta

W - watts

# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1 <i>Preparação das superfícies de titânio</i> .....	22
3.2 <i>Ativação da superfície</i> .....	22
3.3 <i>Funcionalização de superfície</i> .....	23
3.4 <i>Obtenção de cultura de células osteoblásticas</i> .....	24
3.5 <i>Obtenção de cultura de células macrofágicas</i> .....	25
3.6 <i>Determinação da viabilidade celular</i> .....	26
3.7 <i>Morfologia celular</i> .....	26
3.8 <i>Expressão de marcadores macrofágicos por Real Time PCR</i> .....	27
3.9 <i>Atividade in situ da enzima fosfatase alcalina (ALP)</i> .....	29
3.10 <i>Detecção de acúmulos de cálcio/ formação de matriz mineralizada</i> .....	29
3.11 <i>Análise estatística</i> .....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	31
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>8 APÊNDICES</b> .....	50
<b>APÊNDICE A - Epifluorescência de culturas de células macrofágicas RAW 264.7</b> <i>crescidas sobre poliestireno, em 72 h pós-plaqueamento, exibindo (A) células em</i> <i>repouso – fenótipo M0, (B) fenótipo pró-inflamatório M1, quando expostas</i> <i>previamente a 200 ng/mL de LPS por 6 h, e (C) fenótipo pró-reparo M2, quando</i> <i>expostas previamente a 40 ng/mL de IL-4 por 6 h. Fluorescência verde indica o</i> <i>citoesqueleto de actina e azul, os núcleos celulares. Barra de escala = 50 µm.</i> .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

Biomateriais são amplamente utilizados na área da saúde. Na odontologia, estão presentes, principalmente, na forma de implantes dentários e substitutos ósseos, que apresentam a capacidade de restabelecer tecidos perdidos, devolvendo ao paciente função e estética. Para que essas metas sejam atingidas, é necessária uma adequada interação do material com a biologia do hospedeiro e seus tecidos circundantes (FERRARIS *et al.*, 2016).

Considerando que os elementos teciduais interagem com a superfície do biomaterial, desenvolvem-se modificações em sua estrutura química e física com a finalidade de melhorar a sua biocompatibilidade e diminuir os riscos de reações inflamatórias peri-implantares. Destacam-se, nessa estratégia, os revestimentos biofuncionais, constituídos de fatores de crescimento, proteínas e peptídeos da matriz extracelular e medicamentos (SMEETS *et al.*, 2016). Entre as modificações físicas, a topografia da superfície dos implantes dentários, nas escalas macro-, micro- e nanométrica, é uma característica crucial para os fenômenos de adesão e diferenciação de osteoblastos durante a fase inicial da osseointegração, bem como na remodelação óssea a longo prazo (JUNKER *et al.*, 2009).

A macrotopografia de um implante dentário é determinada por sua geometria visível - roscas e design cônico, nas escalas milimétrica e submilimétrica, considerada fundamental para um adequado desempenho clínico (COELHO *et al.*, 2015). Apesar disso, nos últimos anos, estudos têm priorizado o desenvolvimento de micro- e nanotopografias. A microtopografia de titânio é obtida por meio de tratamentos de superfície que utilizam técnicas de fabricação como usinagem, condicionamento ácido, anodização, jateamento



de areia e diferentes procedimentos de revestimento. Características microestruturais possibilitam que células osteogênicas se adiram, proliferem e diferenciem produzindo matriz óssea, estabelecendo uma interface com a superfície do implante (COELHO *et al.*, 2015). Para um adequado desempenho biomecânico, requerem-se, também, modificações na escala nanométrica, da ordem de 1 a 100 nm, com potencial impacto nos fenômenos de interação de moléculas e células com os aspectos nanotopográficos da superfície (MENDONÇA *et al.*, 2008; VARIOLA *et al.*, 2011). Os efeitos específicos da nanotopografia sobre diferentes funções celulares foram demonstrados em células epiteliais, fibroblastos, osteoblastos, macrófagos, mastócitos e células musculares (MENDONÇA *et al.*, 2008; VARIOLA *et al.*, 2011; MARCATTI AMARÚ MAXIMIANO *et al.*, 2017; ARIGANELLO *et al.*, 2018). Por exemplo, alterações na interação inicial proteína-superfície determinadas pela nanotopografia de um biomaterial modulam a adesão de osteoblastos a esta superfície, o que se constitui em aspecto fundamental no processo de osseointegração (BALASUNDARAM; SATO; WEBSTER, 2006). Uma característica interessante de topografias em nanoescala é a seletividade da adesão celular. Vários pesquisadores demonstraram a diminuição relativa da adesão de fibroblastos em comparação à de osteoblastos sobre superfícies estruturadas em nano- e microescala (MCMANUS *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, diversos tratamentos de superfície foram desenvolvidos e utilizados para influenciar as respostas celulares e teciduais. De Oliveira e Nanci (2004) propuseram um tratamento de superfície de titânio por condicionamento com uma mistura de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 30 volumes à temperatura ambiente (T.A.), com

subsequentes lavagens ultrassônicas com água destilada. Por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, observou-se que este tratamento químico resultou na formação de uma textura única caracterizada por nanocavidades com diâmetro médio da ordem de 10 nm. Por sua vez, Spriano, Verné e Ferraris (EP2214732) propuseram tratamento inovador para modificação de superfícies de titânio visando à sua bioatividade. O método constitui-se em processo termoquímico que inclui condicionamento em ácido fluorídrico diluído, seguido de oxidação controlada em peróxido de hidrogênio e tratamento térmico. Obtém-se, com isso, superfície micro e nanotopográfica com composição química modificada, com potencial impacto sobre a atividade celular e a formação tecidual adjacente, e propícia para uma funcionalização biológica, devido à presença de alta densidade de grupos hidroxila (-OH); esses compreendem sítios reativos para ligações covalentes com proteínas importantes para o processo de osseointegração (FERRARIS *et al.*, 2016). A carga negativa da superfície, devido à deprotonação completa do grupo -OH, não apenas atrai fortemente as moléculas de água (maior molhabilidade) e íons ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ) de fluidos fisiológicos (bioatividade com precipitação de hidroxiapatita), mas também permite uma interação eletrostática mais forte com todas as proteínas em pH fisiológico (por exemplo, albumina e fibronectina) e favorece a adesão de moléculas orgânicas quando funcionalizadas sobre a superfície metálica (FERRARIS *et al.*, 2019).

Estudos recentes mostram que a aceleração da osseointegração pode estar associada a uma exacerbação do processo inflamatório. Assim, as pesquisas com biomateriais para implantação óssea têm buscado estimular o processo de regeneração/cicatrização de uma forma mais próxima à fisiológica.

A funcionalização de superfícies com moléculas que atuam no controle da inflamação e no processo de osteogênese surgem como uma alternativa interessante; estudos recentes mostram que polifenóis (PPHE) exibem efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antibacterianos e osteogênicos (SHAVANDI *et al.*, 2018). Ao adsorver PPHE em uma superfície bioativa, é possível combinar as propriedades mecânicas e químicas do substrato além da ação benéfica das biomoléculas. Dessa forma, obtém-se um material biocompatível e bioativo, que possui também importantes propriedades antioxidantes e redutoras de radicais, capaz de exercer ações anti-inflamatórias e antimicrobianas (RICCUCCI *et al.*, 2021).

Os PPHE são micronutrientes obtidos da dieta que desempenham funções importantes na saúde humana. Constituem-se em unidades de múltiplos fenóis, com base no número e na estrutura de ligação das unidades de fenol, e são divididos em quatro grupos, com diferentes propriedades físicas, químicas e biológicas: flavonóides, estilbenos, lignanas e ácidos fenólicos. Seus efeitos protetores nos sistemas alimentares como compostos antioxidantes são bem conhecidos e extensivamente estudados. No entanto, a relevância de sua disponibilização em aplicações de engenharia tecidual é menos conhecida (SHAVANDI *et al.*, 2018).

De acordo com RICCUCCI *et al.* (2021), os PPHE adsorvidos podem ser liberados, após a implantação do material funcionalizado, de duas maneiras diferentes: uma liberação em massa, que consiste em uma liberação rápida e abrupta que ocorre ao longo de poucas horas, e uma liberação lenta, que é caracterizada por fenômenos difusos mais lentos e dispersos no tempo, cujos efeitos podem ser observados até em dias ou em semanas. Ambos os

mecanismos de liberação permitem que os PPHE exerçam suas propriedades não apenas nas primeiras camadas celulares ao redor do implante, mas também nos tecidos mais distantes, devido à sua difusão. Os PPHE enxertados também podem se apresentar firmemente ligados à superfície do biomaterial, permitindo o contato direto com as células ósseas circundantes; as biomoléculas fortemente enxertadas podem exercer localmente suas propriedades por mais tempo, idealmente durante toda a vida útil do implante (CAZZOLA *et al*, 2018).

No desenvolvimento de biomateriais, os PPHE têm sido usados para estabilizar o colágeno e melhorar sua resistência à degradação em sistemas biológicos. Por isso, são indicados para favorecer o desempenho de dispositivos biomédicos em sistemas cardiovasculares, aprimorar as propriedades mecânicas das válvulas cardíacas enxertadas, melhorando a microcirculação por meio do relaxamento das paredes arteriais, o fluxo sanguíneo capilar e a resistência à pressão. Os PPHE podem ainda estimular o processo de formação óssea, com efeitos sobre a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência de osteoblastos, podendo inibir a diferenciação de osteoclastos e, conseqüentemente, reduzir a reabsorção óssea (SHAVANDI *et al.*, 2018).

## **2 PROPOSIÇÃO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar, em modelo de cultura de células, aspectos chave da interação de células das linhagens osteoblástica e macrofágica com superfície de liga de titânio com nanotopografia rica em grupos hidroxila, funcionalizada com PPHE de extrato de bagaço de uva.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Preparação das superfícies de titânio

Discos de titânio grau 5 (Ti6Al4V), com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, foram obtidos de barras cilíndricas (Titanium Consulting and Trading, Buccinasco, Itália) por corte automático. As amostras foram, então, polidas por lixas de grana até 4000 em máquina de polimento mecânico automático e lavadas em banho ultrassônico por 5 min em acetona e 10 min (duas vezes) em água ultrapura (Barnstead™ Nanopure™, ThermoScientific™, Massachusetts, EUA). A qualidade da superfície foi verificada por microscopia de luz, a fim de garantir a homogeneidade das amostras. A superfície das amostras foi modificada conforme descrito anteriormente (FERRARIS *et al.*, 2011; FERRARIS *et al.*, 2019; RICUCCI *et al.*, 2021) e patenteado (SPRIANO; VERNÉ; FERRARIS, EP2214732). O tratamento químico constitui-se em exposição a ácido fluorídrico diluído (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), seguida por oxidação controlada em peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich), formando um óxido nanoporoso de titânio rico em grupos hidroxila, que recebe a nomenclatura de Ti Nano.

#### 3.2 Ativação da superfície

A ativação foi realizada para melhorar a reatividade da superfície pela exposição dos grupos hidroxila, enquanto eventuais contaminações da atmosfera são removidas. O processo de ativação ocorreu por exposição da superfície das amostras à irradiação UV por 1 h (UV-C 40 W; 253,7 nm) (ROY *et al.*, 2016).

### 3.3 Funcionalização de superfície

Os PPHE (PPHE) foram extraídos de bagaços de uva orgânica do tipo Barbera, obtidos da vinícola Tre Secoli (Mombaruzzo, Província de Asti, Itália) (RICCUCCI *et al.*, 2021), por pesquisadores do Conselho de Pesquisa Agropecuária e Análise da Economia Agrícola (CREA), em parceria com o Instituto Politécnico de Turim (POLITO).

Para realizar a funcionalização da superfície dos discos de Ti Nano, foi utilizada solução aquosa composta de Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), HCl e CaCl<sub>2</sub> em água ultrapura. Nesta solução, os PPHE foram dissolvidos para preparar a solução funcionalizante. TRIS e HCl tem ação tampão e permitem obter pH = 7,4. O cálcio foi adicionado à solução com o objetivo de facilitar a adsorção dos PPHE sobre Ti Nano por meio da formação de complexos PPHE-cálcio, conforme descrito anteriormente pelos autores para o ácido gálico (CAZZOLA *et al.*, 2018; FERRARIS *et al.*, 2020). A solução de TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub> foi preparada dissolvendo em 1 L de água ultrapura os seguintes reagentes: CaCl<sub>2</sub> (0,292 g), HCl (39 mL) e TRIS (6,118 g). Por fim, a solução foi armazenada em geladeira a 5 °C e utilizada em um mês. Para a preparação da solução de H<sub>2</sub>O + PPHE, foi seguido o protocolo que envolve a dissolução dos PPHE por 1 h sob agitação, realizada por meio de barra magnética (detalhado em RICCUCCI *et al.*, 2021). A solução funcionalizante tem como solvente a solução anterior com concentração de 5 mg/mL de PPHE, denominada TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub> + PPHE. O processo foi feito no escuro para evitar a exposição da solução à luz, pois os PPHE são fotossensíveis e podem sofrer degradação ou danos. Em seguida, cada amostra de Ti Nano foi colocada em um recipiente escuro com 5 mL de solução de TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub>

+ PPHE. O processo de funcionalização foi realizado em incubadora a 37 °C por 3 h. Ao final, cada amostra foi lavada em água ultrapura por duas vezes, deixada para secar em capela e armazenada em placa de 24 poços no escuro. As amostras funcionalizadas recebem aqui a denominação Ti Nano+PPHE.

#### *3.4 Obtenção de cultura de células osteoblásticas*

Foram utilizadas células da linhagem celular imortalizada MC3T3-E1, subclone 14, de pré-osteoblastos de camundongos (CRL-2594, American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, EUA). Desde sua aquisição junto à ATCC, esta linhagem encontra-se armazenada em nosso laboratório, conservada em tubos criogênicos de 2 mL em tambores de nitrogênio líquido, e foi descongelada e cultivada em garrafas de cultura de 75 cm<sup>3</sup> (Corning Inc.), com 15 mL de meio de cultura  $\alpha$ -MEM (Invitrogen), 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e 2,2 mL de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich). Durante todo o período de cultura, as células foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada 2 dias. Após subconfluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de tratamento com EDTA a 1 mM (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e tripsina a 0,25% (Gibco) e contadas em microscópio com auxílio de hemocitômetro (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). As células foram plaqueadas diretamente sobre as superfícies de Ti Nano e Ti Nano+PPHE em placas de 24 poços, na densidade de 10.000 células/poço, cultivadas em meio de cultura  $\alpha$ -MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 2,2 mL de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich), 5  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico e 7 mM de beta-glicerofosfato (meio



osteogênico), e mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. As trocas de meio de cultura foram realizadas cautelosamente por apenas um operador a cada 2 dias.

### *3.5 Obtenção de cultura de células macrofágicas*

Foram utilizadas células da linhagem macrofágica RAW 264.7 (TIB-71, American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, EUA) antes da décima passagem (TACIAK *et al.*, 2018). Desde sua aquisição junto à ATCC, esta linhagem encontra-se armazenada em nosso laboratório, conservada em tubos criogênicos de 2 mL em tambores de nitrogênio líquido e, quando necessário, são descongeladas para obtenção das culturas. As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>3</sup> (Corning Inc.) com 15 mL de meio de cultura D-MEM (Invitrogen), 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen) e 2,2 mL de penicilina-estreptomicina (Gibco). As garrafas foram mantidas em ambiente umidificado a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Quando atingida subconfluência, as células foram removidas utilizando o método de raspagem, contadas e plaqueadas diretamente sobre as superfícies de Ti Nano e Ti Nano+PPHE em placas de 24 poços, na densidade de 100.000 células/poço, e mantidas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. A progressão das culturas foi avaliada em microscópio de fase invertido Axiovert 25 (Zeiss) e a troca de meio, cautelosamente realizada por um único operador a cada 2 dias.

### 3.6 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular em culturas crescidas sobre os discos Ti Nano e Ti Nano+PPHE foi avaliada em 3, 7 e 12 dias para a linhagem MC3T3-E1 e em 3 dias para a RAW 264.7, utilizando o método de redução de um corante redox (resazurina). O ensaio, realizado com o reagente CellTiter-Blue (Promega, Madison, WI, USA) seguindo as recomendações do fabricante, é baseado na capacidade das células vivas de converter a resazurina em um produto final colorimétrico (resorufina), sendo que as não viáveis perdem a capacidade metabólica e, portanto, não geram um sinal observável (CHEN; STEELE; STUCKEY, 2018). Para isso, 20  $\mu$ L do reagente foram diluídos em 100  $\mu$ L de meio de cultura suplementado e os 120  $\mu$ L foram despejados em cada poço, o que foi seguido por incubação de 4 h a 37 °C. Após decorrido período, o sobrenadante formado foi retirado dos poços e transferido para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570-600 nm, Epoch 2, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA).

### 3.7 Morfologia celular

Após 3 dias, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram processadas rotineiramente para fluorescência direta (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 min e as células foram então incubadas com faloidina conjugada com AlexaFluor 488 (fluorescência verde) (1:200, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, EUA) para marcação do citoesqueleto de actina, em atmosfera úmida por 60 min, em T.A. Antes da montagem para

observação microscópica, as amostras foram lavadas rapidamente com água destilada e os núcleos celulares marcados com DAPI (Molecular Probes) a 300 nM por 5 min. Os discos de Ti Nano e Ti Nano+PPHE foram montados diretamente em lâminas de vidros, e em seguida, após montagem da lamínula de vidro Fisherbrand 12 mm (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) com meio de montagem anti-fade (Prolong, Molecular Probes) sobre as superfícies contendo células, as amostras foram examinadas utilizando microscópio de fluorescência Leica modelo DMLB (Leica), acoplado a uma câmara digital Leica DC 300F. As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop CS5.1 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA).

### *3.8 Expressão de marcadores macrofágicos por Real Time PCR*

Ao final de 3 dias, a expressão de marcadores macrofágicos foi avaliada por *Real Time PCR*, quantificando-se óxido nítrico induzível (iNOS), arginase 1 (Arg1), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ). Como controle, foi avaliada a expressão do gene constitutivo  $\beta$ -actina (ACTB). Para este ensaio, o meio de cultura foi removido dos poços e adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen, EUA) à T.A., por 5 min, sob agitação por pipetagem. Foi realizada a extração do RNA total por meio do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) no aparelho GeneQuant 1300 (GE Healthcare, Cardiff, WLS, Reino Unido). A integridade das amostras foi avaliada por meio do aparelho

Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), a partir de 100 ng do RNA total, seguindo as instruções do fabricante, sendo que valores de RIN (sigla em inglês para *RNA integrity number*) superiores a 7 foram considerados adequados (FLEIGE; PFAFFL, 2006; SCHROEDER *et al.*, 2006). Após extração do RNA total, o cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA por reação de transcrição reversa utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados ao RNA: 2 µL de (10X) RT buffer, 0,8 µL de (25X) dNTP mix (100 mM), 2 µL (10X) RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase Inhibitor e 3,2 µL de água DEPC, para um volume final de 20 µL/reação. Em seguida, a amostra foi incubada a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min, 85 °C por 5 min, seguido pelo resfriamento a 4 °C. Ao final da reação, a amostra foi mantida refrigerada e o cDNA foi estocado em freezer a -20 °C. Para as reações de *Real Time PCR*, foi utilizado o sistema SYBR, com primers previamente desenhados e sintetizados para os genes-alvo e de referência. As reações foram realizadas no aparelho Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Hamburgo, HH, DE), em triplicata (n=3), utilizando 2 µL de água livre de nuclease, 5 µL de Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies), 0,5 µL de primer Forward, 0,5 µL de primer Reverse e 2 µL de cDNA (5 ng), para um volume final de 10 µL/reação. As reações de amplificação consistiram em 20 s a 95 °C, 3 s a 95 °C para desnaturação e quarenta ciclos de 30 s a 60 °C (anelamento e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold* – ou ciclo limiar) e todas as amostras foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro de ACTB, sendo uma amostra

negativa (água) submetida à reação com cada par de primers utilizado. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de Livak e Schmittgen (2001). Usando esse método, os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pelo gene constitutivo.

### *3.9 Atividade in situ da enzima fosfatase alcalina (ALP)*

Após 12 dias de cultura de células MC3T3-E1, a atividade de ALP *in situ* foi avaliada por marcação pelo método Fast Red (MAJORS *et al.*, 1997). O meio de cultura foi removido dos poços e as culturas, lavadas com solução de Hank (Hank's Balanced Salts, Sigma-Aldrich) aquecida a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 200 µL/poço de solução tampão Tris (Sigma-Aldrich) a 120 mM com pH 8,4, contendo 1,8 mM de Fast Red TR (Sigma-Aldrich), 0,9 mM de naftol-ASMX-fosfato (Sigma-Aldrich) e 1:9 de dimetilformamida (Merck KGaA, Darmstadt, HE, Alemanha). As placas foram mantidas por 30 min em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Após esse período, a solução foi removida e as placas foram deixadas a secar à T.A. Imagens macroscópicas dos poços foram obtidas digitalmente com estereomicroscópio MZ6 (Leica, Wetzlar, LDK, Alemanha), acoplado a uma câmera digital de alta resolução Leica DC 300F (Leica).

### *3.10 Detecção de acúmulos de cálcio/ formação de matriz mineralizada*

Em 14 e 18 dias de culturas MC3T3-E1, os poços contendo as culturas crescidas sobre Ti Nano e Ti Nano+PPHE foram lavados com solução Hanks, fixados em álcool etílico a 70% a 4 °C por 60 min e lavados com PBS e água

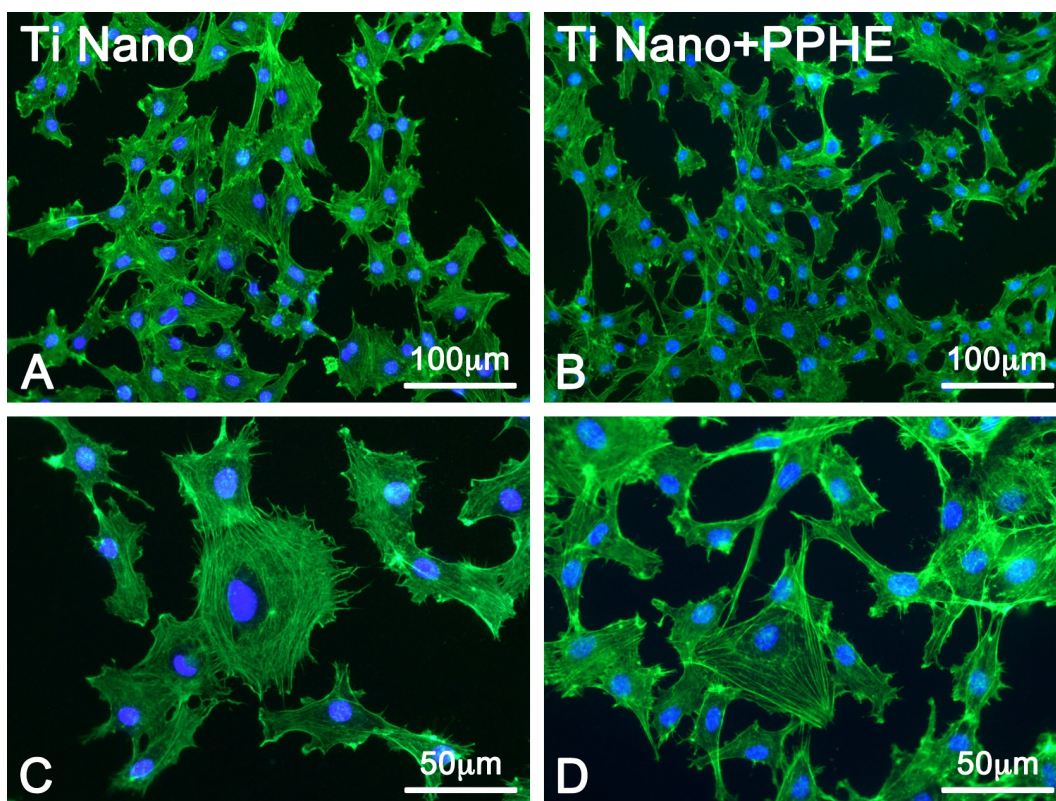
deionizada. Posteriormente, foram corados com vermelho de Alizarina a 2%, pH 4,2 à T.A. por 15 min, novamente lavados com PBS e água deionizada e deixados a secar. Imagens macroscópicas dos poços foram obtidas digitalmente com estereomicroscópio MZ6 (Leica), acoplado a uma câmera digital de alta resolução Leica DC 300F (Leica). A quantificação bioquímica da mineralização foi realizada por método colorimétrico de acordo com Gregory *et al.* (2004). Após a coloração com o vermelho de Alizarina, foram adicionados 360 µL de ácido acético a 10% em cada poço, e a placa foi levada ao agitador por 30 min à T.A. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos Eppendorf, e então aquecido a 85 °C por 10 min e, posteriormente, mantido no gelo por 5 min. Os tubos foram centrifugados a 10.500 g, a 23 °C por 15 min. Em seguida, 100 µL do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para um novo tubo. Então, 40 µL de hidróxido de amônio a 10% foram adicionados em cada tubo para neutralizar o ácido, e todo o conteúdo (140 µL) foi transferido para uma placa de 96 poços. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (405 nm, Epoch 2).

### 3.11 Análise estatística

Os dados quantitativos de viabilidade celular, formação de matriz mineralizada e expressão de marcadores macrofágicos foram comparados aplicando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, para amostras independentes, com nível de significância de 5%, utilizando o programa Sigma Plot, versão 12.0.

#### 4 RESULTADOS

Em 3 dias de cultura, células osteogênicas da linhagem MC3T3-E1 estavam aderidas e espreiadas sobre as superfícies de Ti Nano e Ti Nano+PPHE, exibindo morfologia poligonal e, por vezes, extensões citoplasmáticas delgadas. Não se observaram diferenças morfológicas relevantes entre as culturas crescidas sobre as duas superfícies, senão uma tendência a espreiamento celular menor sobre Ti Nano+PPHE. Nesse tempo, as culturas não eram confluentes e figuras de mitose eram frequentes. Em áreas de baixa densidade celular, notavam-se, eventualmente, aspectos morfológicos típicos de células em migração uni-, bi e multidirecional (Figura 1).



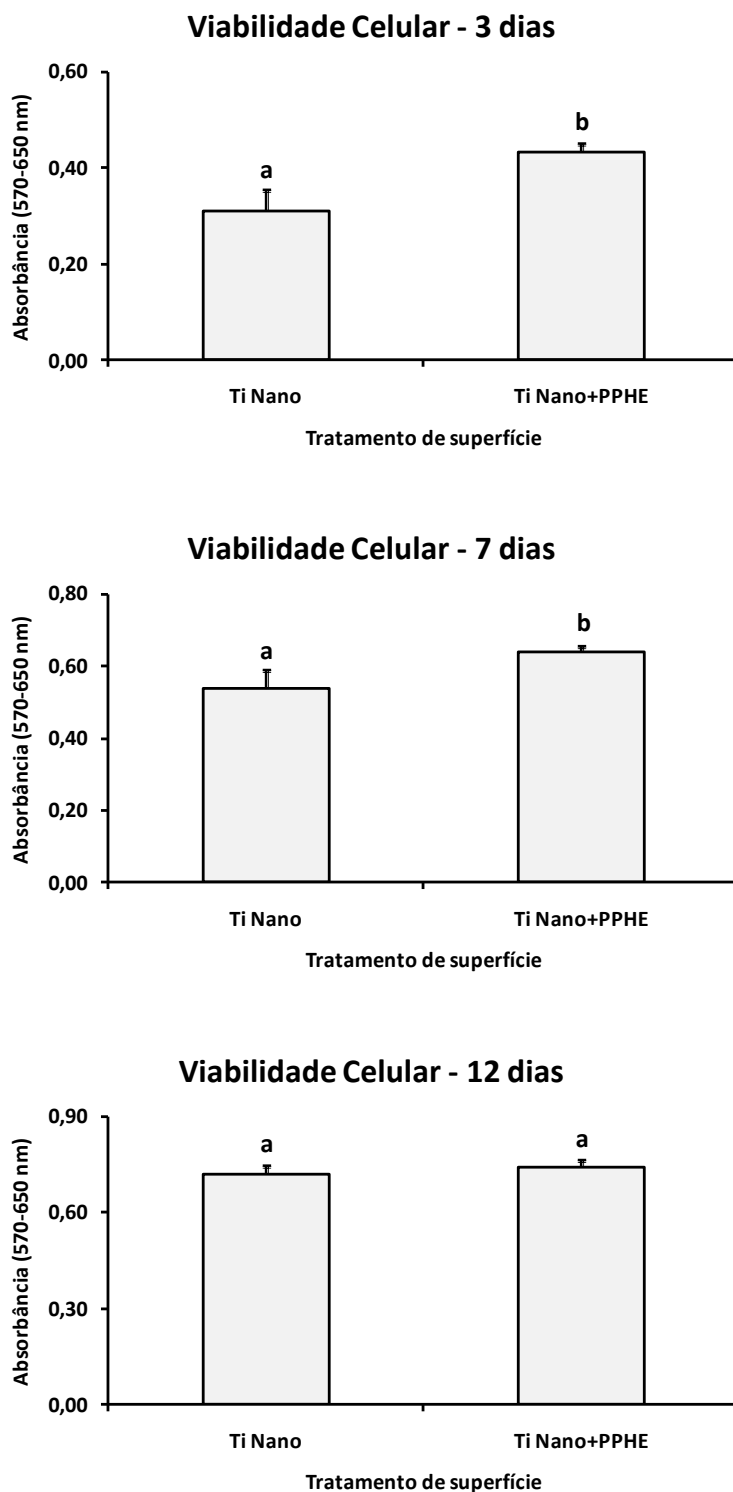
**Figura 1.** Epifluorescência de culturas de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti Nano (A e C) e Ti Nano+PPHE (B e D) em 3 dias. Fluorescência verde revela o citoesqueleto de actina e a azul, núcleos celulares. Note-se em Ti Nano+PPHE (B e D), tendência a espreiamento menor das células.

Os resultados do ensaio de CellTiter-Blue mostraram que as culturas crescidas sobre Ti Nano+PPHE apresentavam-se com maior viabilidade celular se comparadas às crescidas sobre de Ti Nano em 3 e 7 dias; em 12 dias, os valores obtidos para as culturas sobre as duas superfícies não diferiam entre si. Para os dois grupos, os valores foram crescentes de 3 para 12 dias (Figura 2, A-C). Em 12 dias, a atividade de ALP *in situ* ocorreu homogeneamente por toda a extensão das culturas sobre as duas superfícies de Ti, as quais, à observação macroscópica, passavam a exibir cor vermelha intensa (Figure 3).

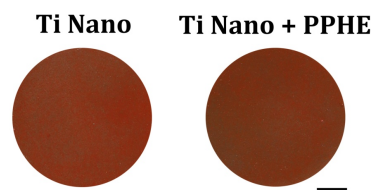
O ensaio de mineralização mostrou que as culturas de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Nano e Ti Nano+PPHE se apresentaram coradas pelo vermelho de Alizarina intensamente e por toda a extensão das superfícies dos discos nos tempos de 14 e 18 dias, com áreas de aspectos puntiformes com intensidade de vermelho ainda maior observadas macroscopicamente (Figura 4, A e B). À análise quantitativa, notaram-se valores menores para as culturas sobre Ti Nano+PPHE em comparação ao Ti Nano em 14 dias (Figura 4A), mas sem diferenças significantes entre os grupos em 18 dias (Figura 4B).

Os resultados da interação de células macrofágicas da linhagem RAW 264.7 com Ti Nano e Ti Nano+PPHE estão apresentados nas Figuras 5-7. Em 3 dias, sobre as duas superfícies, as células RAW 264.7 mostravam-se aderidas, com aspectos morfológicos esféricos, por vezes exibindo espraiamento multidirecional com formações de lamelipódios ou eventualmente apresentando-se fusiformes, com longas extensões citoplasmáticas bidirecionais (Figura 5). Nesse tempo, não se observou diferença estatisticamente significante para a viabilidade celular entre os grupos (Figura 6).



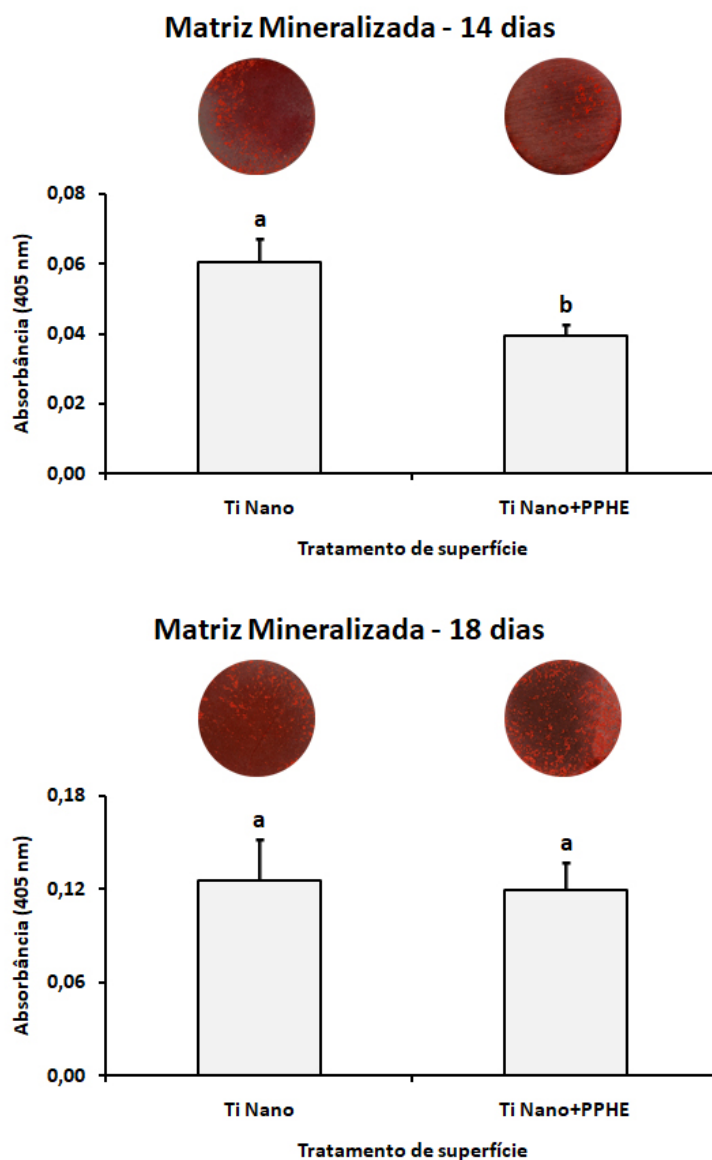


**Figura 2.** Viabilidade celular em densidade óptica, por ensaio de CellTiter-Blue, nos dias 3, 7 e 12 de culturas de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti Nano e Ti Nano+PPHE. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ). Em 3 e 7 dias, a viabilidade celular é maior em culturas crescidas sobre Ti Nano+PPHE.

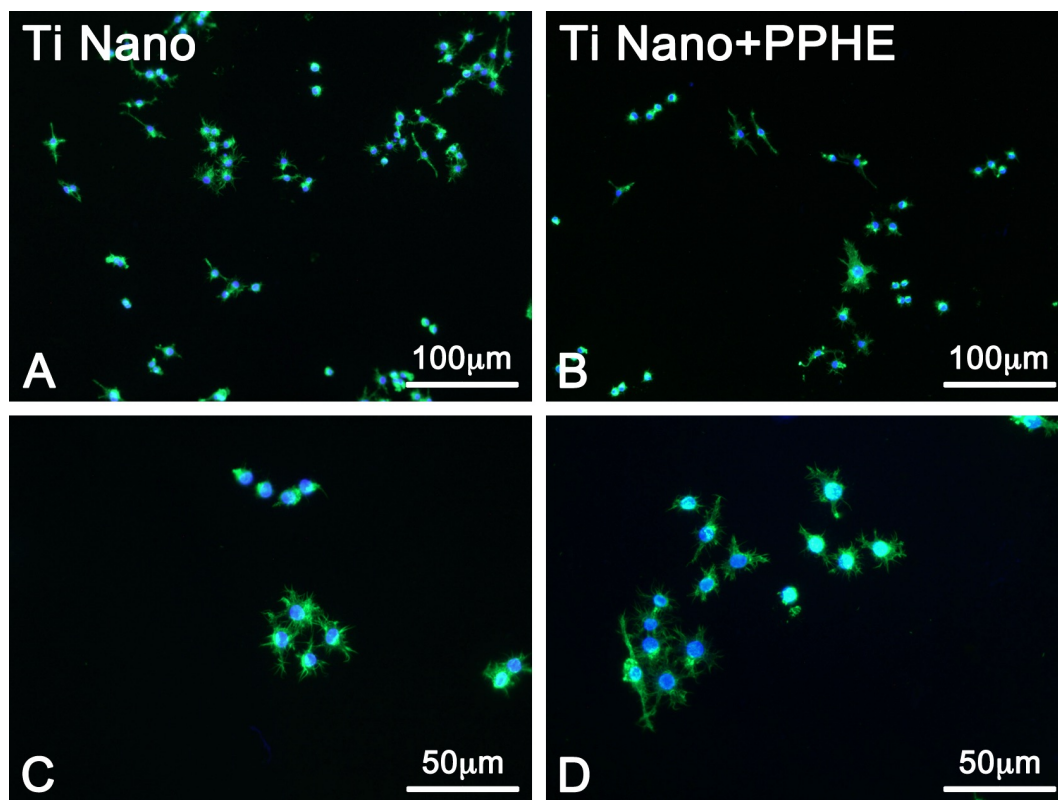
Atividade de ALP *in situ* – 12 dias

**Figura 3.** Imagens macroscópicas de atividade de ALP *in situ* pelo método do Fast Red em 12 dias de culturas de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Nano e Ti Nano+PPHE. Note-se distribuição homogênea de coloração vermelha por toda a extensão das culturas sobre as duas superfícies. Barra de escala = 2,2 mm.

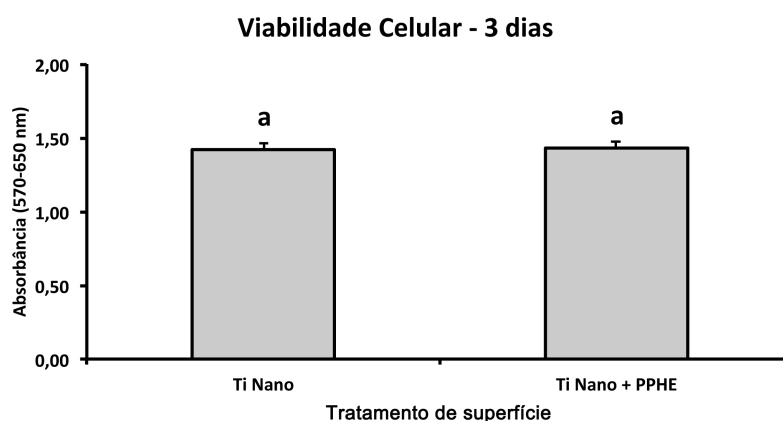
Em 5 dias de cultura, células RAW 264.7 exibiram maior expressão de *iNOS*, *Arg1*, *TNF- $\alpha$*  e *GM-CSF* quando crescidas sobre Ti Nano+PPHE em comparação a Ti Nano (Figura 7, A-D). A expressão de *NRF2* e *IL-1 $\beta$*  manteve-se semelhante nas culturas sobre as duas superfícies (Figura 7, E e F), ainda que se tenha observado uma tendência a valores menores de *NRF2* sobre Ti Nano+PPHE (Figura 7E).



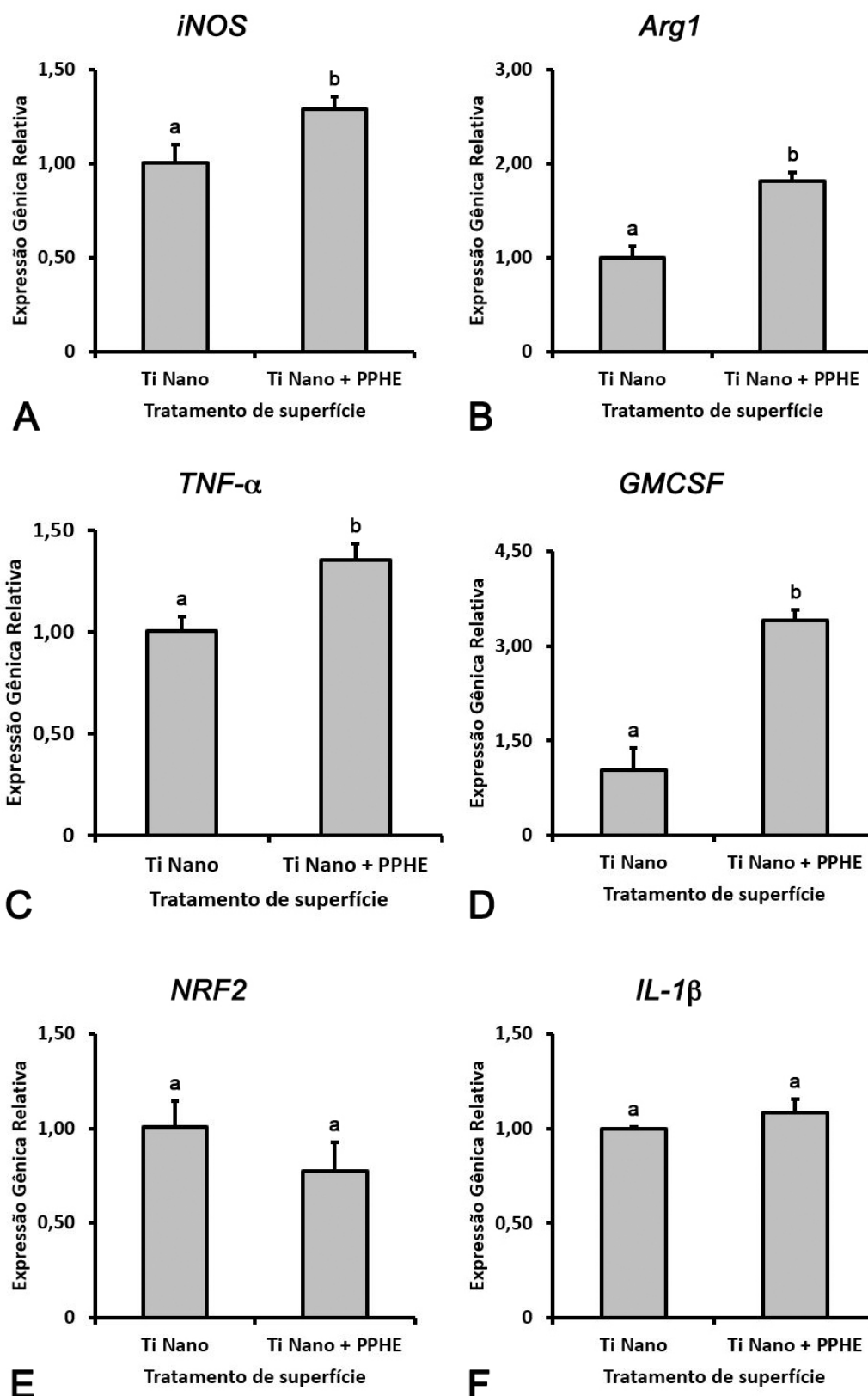
**Figura 4.** Imagens macroscópicas e quantificação da mineralização por coloração com vermelho de Alizarina, que detecta depósitos de cálcio, de culturas de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti Nano e Ti Nano+PPHE, em 14 e 18 dias. Macroscopicamente, as culturas MC3T3-E1 se apresentavam coradas por toda a extensão das superfícies dos discos – 10 mm de diâmetro – nos dois grupos, com áreas de aspectos puntiformes com maior intensidade de vermelho. A extração bioquímica do corante revelou maiores valores de mineralização para culturas sobre Ti Nano em comparação a Ti Nano+PPHE em 14 dias, mas estatisticamente iguais em 18 dias. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ).



**Figura 5.** Epifluorescência de culturas de células macrofágicas RAW 264.7 crescidas sobre superfícies de Ti Nano (A e C) e Ti Nano+PPHE (B e D) em 3 dias. Fluorescência verde revela o citoesqueleto de actina e a azul, núcleos celulares. Notem-se sobre as duas superfícies células com aspectos morfológicos esféricos, com espraiamento multidirecional ou fusiformes, exibindo longas extensões citoplasmáticas bidirecionais.



**Figura 6.** Viabilidade celular em densidade óptica, por ensaio de CellTiter-Blue, de culturas de células macrofágicas RAW 264.7 crescidas sobre superfícies de Ti Nano e Ti Nano+PPHE em 3 dias. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ). A viabilidade celular manteve-se semelhante sobre as duas superfícies.



**Figura 7.** Expressão relativa de RNA mensageiro para *iNOS* (A), *Arg1* (B), *TNF-α* (C), *GMCSF* (D), *NRF2* (E) e *IL-1β* (F) de células RAW 264.7 crescidas sobre Ti Nano e Ti Nano+PPHE, em 5 dias. Os dados foram normalizados por GAPDH e o valor 1, atribuído ao Ti Nano. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a funcionalização de superfície de Ti Nano – cuja caracterização físico-química revela quantidade expressiva de grupos hidroxila (RICCUCCI *et al.*, 2021) – com solução de extrato de bagaço de uva a 5 mg/mL altera parâmetros importantes da interação de células pré-osteoblásticas e de células macrofágicas com essa superfície em culturas bidimensionais. Culturas MC3T3-E1 sobre Ti Nano+PPHE exibem tendência a menor espreadimento celular e maior viabilidade em períodos iniciais do cultivo – 3 e 7 dias –, com potencial osteogênico expressivo e crescente de 14 a 18 dias, quando se assemelha ao observado em culturas sobre Ti Nano. Culturas RAW 264.7 exibem células aderidas e espreadas sobre Ti Nano e Ti Nano+PPHE em 3 dias, com aspectos semelhantes entre si de variabilidade morfológica e de viabilidade celular, mas com maior expressão de *iNOS*, *Arg1*, *TNF- $\alpha$*  e *GM-CSF* sobre Ti Nano+PPHE em 5 dias.

Em estudo anterior de nosso grupo, Scannavino (2021) desenvolveu a estratégia de funcionalizar superfície de titânio com solução de mesmo extrato de bagaço de uva, rico em PPHE e, particularmente, epicatequina. Entretanto, utilizou-se de superfície obtida por tratamento químico com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio, com reduzida quantidade de grupos hidroxila (YI *et al.*, 2006), que resultava em distribuição inhomogênea de PPHE a partir de solução em menor concentração do extrato (1 mg/mL) – ainda assim, observavam-se efeitos biológicos importantes sobre células osteoblásticas da linhagem UMR-106, com aumento da expressão de fosfatase alcalina, sialoproteína óssea e colágeno, ainda que relativamente modestos sobre o estímulo à aquisição do

fenótipo osteogênico. Assim, no presente estudo, optamos por utilizar superfície de liga de Ti6Al4V com camada superficial de óxido nanoporosa, rica em grupos hidroxila e com comportamento químico ácido, adequada para o processo de funcionalização de PPHE – a 5 mg/mL a concentração do extrato –, o que mostrou resultar em sua distribuição homogênea por toda a superfície de Ti Nano e com agregados na microescala, e na manutenção de sua capacidade química redox e de eliminação de radicais (RICCUCCI *et al.*, 2021).

Em que pesem as evidências de efeitos estimuladores de PPHE sobre a diferenciação de osteoblastos e sua função, com aumento da expressão de *Runx2* por diversas vias de sinalização e indução à expressão de genes relacionados à produção de matriz óssea mineralizada, como a sialoproteína óssea (discutido em TORRE *et al.*, 2020), os aspectos físico-químicos de Ti Nano+PPHE considerados como mais favoráveis quando comparados aos de nanotopografia de Ti funcionalizada com PPHE por Scannavino (2021) não foram suficientes para promover um aumento significativo na mineralização das culturas em relação ao grupo controle Ti Nano. Isso poderia ser explicado, pelo menos parcialmente, pelo fato de haver limitações nos modelos de culturas bidimensionais de células osteoblásticas em reproduzir os fenômenos que ocorrem *in vivo* durante o processo de reparo ósseo na interface com materiais aloplásticos, particularmente a ausência de renovação celular e de efeitos parácrinos de células presentes no coágulo sanguíneo e no tecido conjuntivo – tais como fibroblastos, mastócitos e macrófagos –, cujas funções podem ser também moduladas pela disponibilidade de PPHE no meio extracelular (OVERMAN *et al.*, 2010; KLOESCH *et al.*, 2012; BOGNAR *et al.*, 2013; BILOTTA *et al.*, 2021; CHOWDHURY *et al.*, 2021; DARAWSHA *et al.*, 2021),

com potencial impacto sobre a diferenciação osteogênica (WANG; LU, 2006; PIRRACO *et al.*, 2012; HORWOOD, 2016; MAXIMIANO *et al.*, 2017).

Apesar de nas condições experimentais utilizadas, a superfície de Ti Nano+PPHE não alterar significativamente a quantidade de matriz mineralizada formada *in vitro* – o evento final de culturas de células osteoblásticas –, notou-se que, em momentos iniciais das culturas, promovia o aumento da viabilidade celular e tendência a menor espraçamento celular, eventos que poderiam favorecer o reparo ósseo *in vivo* (PEREIRA *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2022). Entretanto, particularmente para células comprometidas com a diferenciação osteogênica, o aumento de sua viabilidade, provavelmente induzido pela capacidade de PPHE em remover espécies reativas de oxigênio (ROS, na sigla em inglês) (MAGRONE *et al.*, 2020), poderia “paradoxalmente” limitar o processo de mineralização induzido por fosfato inorgânico – dependente da produção de ROS intracelular (KHALID *et al.*, 2020), o que, com efeito, foi observado no presente estudo, mas apenas para o tempo inicial de mineralização das culturas (14 dias). Por sua vez, a tendência ao menor espraçamento celular, se confirmada em estudo futuro, poderia estar relacionada à redução da alta hidrofiliabilidade de nanotopografia de Ti quando recoberta por compostos orgânicos, como os PPHE, como demonstrado em estudos anteriores, incluindo os de nosso grupo (WEBB *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2013; SCANNAVINO, 2021), embora se possa obter redução do espraçamento celular sobre superfícies semelhantemente nanoestruturadas mas com molhabilidades distintas – super-hidrofílica ou altamente hidrofóbica (HU *et al.*, 2010), indicando a importância da nanotopografia em si no controle desse fenômeno.



A análise morfológica de células macrofágicas RAW 264.7, por epifluorescência, revelou que tanto sobre Ti Nano como sobre Ti Nano+PPHE, havia uma variação comum de aspectos fenotípicos, representados por células em repouso (M0), pró-inflamatórias (M1) e pró-reparo (M2) (HE *et al.*, 2018) (compare-se Figura 5 com Apêndice A), cujas proporções relativas não foram determinadas. No mesmo período de análise, as culturas dos dois grupos apresentavam-se com viabilidades celulares semelhantes. Assim, por não haver uma predominância aparente de qualquer um desses fenótipos nas culturas sobre as duas superfícies em 3 dias, optamos por não induzi-las a M1 ou a M2 para a análise de expressão de RNAm em 5 dias. Sabe-se, por exemplo, que a morfologia arredondada de macrófagos inibe sua polarização para o fenótipo M2 induzida por IL-4/IL-13. Por outro lado, se as células se tornam alongadas em sua interação com uma superfície específica, aumentam a expressão de *Arg1* induzida por IL-4/IL-13 e limitam a de *iNOS* induzida por IFN- $\gamma$ /LPS, portanto estimulando sua polarização para M2 (MCWHORTER *et al.*, 2013).

No presente estudo, independentemente de os genes avaliados estarem associados aos fenótipos M1 e/ou M2 – podendo não haver a direta correspondência entre as realidades *in vitro* e *in vivo*, e um mesmo gene promover efeitos tanto pró-inflamatório como pró-reparo no tecido ósseo (POSTIGLIONE *et al.*, 2003; ORECCHIONI *et al.*, 2019), aqueles cujos transcritos foram mais expressos em culturas RAW 264.7 sobre Ti Nano+PPHE – *iNOS*, *Arg1*, *TNF- $\alpha$*  e *GMCSF* – poderiam modular o processo de formação óssea por meio de suas proteínas correspondentes. Por exemplo, a maior expressão de *iNOS* resulta em maior concentração de NO, com potencial efeito

inibidor sobre as atividades osteoblástica e osteoclástica; em menores concentrações, o NO é estimulador da diferenciação de osteoblastos e da função de osteoclastos (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Assim, ainda que a expressão de *iNOS* tenha sido relacionada ao fenótipo pró-inflamatório M1, poderia resultar em efeitos pró-reparo no tecido ósseo. Por sua vez, a expressão de *Arg1* tem sido relacionada ao fenótipo M2, como descrito anteriormente, e mesmo que não se conheçam suas funções em uma condição homeostática, em processos inflamatórios atua na síntese de colágeno, com a produção de ornitina, favorecendo a regeneração tecidual (MUÑOZ *et al.*, 2020). Além disso, a sobre-expressão de *Arg1* inibe a diferenciação osteoclástica, com baixa produção de NO (YEON *et al.*, 2016). Em relação ao *TNF- $\alpha$* , sua maior expressão em culturas RAW 264.7 sobre Ti Nano+PPHE é fortemente indicativa da presença de células com a polarização M1. Além do reconhecido efeito estimulador sobre a atividade osteoclástica direta ou indiretamente (MARAHLEH *et al.*, 2019), constitui-se em potente inibidor da diferenciação de osteoblastos (GILBERT *et al.*, 2000). A expressão aumentada de *GM-CSF* leva a um ambiente mais pró-inflamatório, com a presença de *TNF- $\alpha$*  (ORECCHIONI *et al.*, 2019), mas induz a expressão de *Runx2* em células MC3T3-E1 (PEI *et al.*, 2003). Por fim, a expressão de *RNF2* em macrófagos inibe a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias (revisado em ZHU *et al.*, 2016), enquanto que a de *IL-1 $\beta$*  tem sido associada à indução de reabsorção óssea e à inibição da migração e do recrutamento de osteoblastos (HENGARTNER *et al.*, 2013), sendo que ambas se mantiveram estatisticamente inalteradas nas células RAW 264.7 na presença ou não de recobrimento de PPHE sobre Ti Nano.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos com células macrofágicas *in vitro* reforçam o conceito de que cada fase do reparo tecidual adjacente a biomateriais, com células em diferentes estados de diferenciação e/ou função em orquestração de alta complexidade, contribui efetivamente para a aquisição do fenótipo ósseo, idealmente sem que o processo inflamatório se prolongue indesejavelmente (NIU *et al.*, 2020).

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que:

1. a funcionalização de titânio com nanotopografia com polifenóis derivados de extrato de bagaço de uva promove alterações em parâmetros da interação de células osteoblásticas e macrofágicas, em modelo de cultura bidimensional, com potencial impacto no processo de reparo ósseo na interface com implantes metálicos osseointegráveis;

2. sobre superfícies funcionalizadas com polifenóis, células osteoblásticas apresentam-se com maior viabilidade e tendência a menor espriamento, e com potencial osteogênico que se assemelha ao de culturas sobre nanotopografia de titânio não funcionalizada;

3. células macrofágicas exibem variabilidade morfológica e viabilidade semelhantes entre si sobre as duas superfícies estudadas, além de aumento expressivo de RNAm para *iNOS*, *Arg1*, *TNF- $\alpha$*  e *GM-CSF* quando cultivadas sobre a nanotopografia com polifenóis.

## 7 REFERÊNCIAS

ARIGANELLO, M.B.; GUADARRAMA BELLO, D.; RODRIGUEZ-CONTRERAS, A.; SADEGHI, S.; ISOLA, G.; VARIOLA, F.; NANJI, A. Surface nanocavitation of titanium modulates macrophage activity. **Int J Nanomedicine**, v. 13, p. 8297–8308, 2018.

BALASUNDARAM, G.; SATO, M.; WEBSTER, T.J. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. **Biomaterials**, v. 27, p. 2798–2805, 2006.

BILOTTA, S.; PARUCHURU, L.B.; FEILHAUER, K.; KÖNINGER, J.; LORENTZ, A. Resveratrol Is a Natural Inhibitor of Human Intestinal Mast Cell Activation and Phosphorylation of Mitochondrial ERK1/2 and STAT3. **Int J Mol Sci**, v. 22, p. 7640, 2021.

BOGNAR, E.; SARSZEGI, Z.; SZABO, A.; DEBRECENI, B.; KALMAN, N.; TUCSEK, Z.; SUMEGI, B.; GALLYAS, F., Jr. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in RAW264.7 Macrophages of Malvidin, a Major Red Wine Polyphenol. **PLoS ONE**, v. 8, p. e65355, 2013.

CAZZOLA, M.; FERRARIS, S.; BOSCHETTO, F.; RONDINELLA, A.; MARIN, E.; ZHU, W.; PEZZOTTI, G.; VERNÈ, E.; SPRIANO, S. Green tea polyphenols coupled with a bioactive titanium alloy surface: In vitro characterization of osteoinductive behavior through a KUSA A1 cell study. **Int J Mol Sci**, v. 19, p. 2255, 2018.

CHEN, J.L.; STEELE, T.W.J.; STUCKEY, D.C. Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. **Biotechnol Bioeng**, v. 115, n. 2, p. 351–358, 2018.

CHOWDHURY, A.; NOSOUDI, N.; KARAMCHED, S.; PARASARAM, V., VYAVAHARE, N. Polyphenol treatments increase elastin and collagen deposition by human dermal fibroblasts; Implications to improve skin health. **J Dermatol Sci**, v. 102, p. 94–100, 2021.

COELHO, P.G.; JIMBO, R.; TOVAR, N.; BONFANTE, E.A. Osseointegration: hierarchical designing encompassing the macrometer, micrometer, and nanometer length scales. **Dent Mater**, v. 31, p. 37–52, 2015.

DARAWSHA, A.; TRACHTENBERG, A.; LEVY, J.; SHARONI, Y. The Protective Effect of Carotenoids, Polyphenols, and Estradiol on Dermal Fibroblasts under Oxidative Stress. **Antiox**, v. 10, p. 2023, 2021.

DE OLIVEIRA, P.T.; NANJI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**, v. 25, p. 403–413, 2004.

DE OLIVEIRA, P.T.; ZALZAL, S.F.; BELOTI, M.M.; ROSA, A.L.; NANJI, A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. **J Biomed Mater Res A**, v. 80, p. 554–564, 2007.

FERRARIS, S.; CAZZOLA, M.; UBERTALLI, G.; PRENESTI, E.; SPRIANO, S. Grafting of gallic acid to metallic surfaces. **Appl Surf Sci**, v. 511, p. 145615, 2020.

FERRARIS, S.; COCHIS, A.; CAZZOLA, M.; TORTELLO, M.; SCALIA, A.; SPRIANO, S.; RIMONDINI, L. Cytocompatible and anti-bacterial adhesion nanotextured titanium oxide layer on titanium surfaces for dental and orthopaedic implants. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 7, p. 1–6, 2019.

FERRARIS, S.; SPRIANO, S.; PAN, G.; VENTURELLO, A.; BIANCHI, C.L.; CHIESA, R.; VERNE, E. Surface modification of Ti–6Al–4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification. **J Mater Sci Mater Med**, v. 22, p. 533–545, 2011.

FERRARIS, S.; VITALE, A.; BERTONE, E.; GUASTELLA, S.; CASSINELLI, C.; PAN, J.; SPRIANO, S. Multifunctional commercially pure titanium for the improvement of bone integration: Multiscale topography, wettability, corrosion resistance and biological functionalization. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 60, p. 384–393, 2016.

FLEIGE, S.; PFAFFL M.W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Mol Aspects Med**, v. 27, p.126–139, 2006.

GILBERT, L.; HE, X.; FARMER, P.; BODEN, S.; KOZLOWSKI, M.; RUBIN, J.; NANES, M.S. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Endocrinology**, v. 141, p. 3956–3964, 2000.

GREGORY, C.A.; GUNN, W.G.; PEISTER, A.; PROCKOP, D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Anal Biochem**, v. 329, p. 77–84, 2004.

HE, X.-T.; LI, X.; YIN, Y.; WU, R.-X.; XU, X.-Y.; CHEN, F.-M. The Effects of Conditioned media Generated by Polarized Macrophages on the Cellular Behaviours of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **J Cel Mol Med**, v. 22, p. 1302–1315, 2018.

HENGARTNER, N.E.; FIEDLER, J.; IGNATIUS, A.; BRENNER, R.E. IL-1 $\beta$  Inhibits Human Osteoblast Migration. **Mol Med**, v. 19, p. 36–42, 2013.

HORWOOD, N.J. Macrophage Polarization and Bone Formation: A review. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 51, p. 79–86, 2016.

HU, W.; CROUCH, A.S.; MILLER, D.; ARYAL, M.; LUEBKE, K.J. Inhibited cell spreading on polystyrene nanopillars fabricated by nanoimprinting and in situ elongation. **Nanotechnol**, v. 21, p. 385301, 2010.

JUNKER, R.; DIMAKIS, A.; THONEICK, M.; JANSEN, J.A. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, p. 185–206, 2009.

KHALID, S.; YAMAZAKI, H.; SOCORRO, M.; MONIER, D.; BENIASH, E.; NAPIERALA, D. Reactive oxygen species (ROS) generation as an underlying

mechanism of inorganic phosphate (P<sub>i</sub>)-induced mineralization of osteogenic cells. **Free Radic Biol Med**, v. 153, p. 103–111, 2020.

KLOESCH, B.; DIETERSDORFER, E.; BROELL, J.; KIENER, H.; STEINER, G. The polyphenols curcumin and resveratrol effectively block IL-1 $\beta$  and PMA-induced IL-6, IL-8 and VEGF-A expression in human rheumatoid synovial fibroblasts. **Ann Rheum Dis**, v. 71, p. A90–A91, 2012.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method. **Methods**, v. 25, p. 402–8, 2001.

MAGRONE, T.; MAGRONE, M.; RUSSO, M.A.; JIRILLO, E. Recent Advances on the Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Red Grape Polyphenols: In Vitro and In Vivo Studies. **Antiox**, v. 9, p. 35, 2020.

MAJORS, A.K.; BOEHM, C.A.; NITTO, H.; MIDURA, R.J.; MUSCHLER, G.F. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. **J Orthop Res**, v. 15, p. 546–557, 1997.

MARAHLEH, A.; KITaura, H.; OHORI, F.; KISHIKAWA, A.; OGAWA, S.; SHEN, W-R.; QI, J.; NOGUCHI, T.; NARA, Y.; MIZOGUCHI, I. TNF- $\alpha$  Directly Enhances Osteocyte RANKL Expression and Promotes Osteoclast Formation. **Front Immunol**, v.10, p. 2925, 2019.

MARCATTI AMARÚ MAXIMIANO, W.; MARINO MAZUCATO, V.; TAMBASCO DE OLIVEIRA, P.; CÉLIA JAMUR, M.; OLIVER, C. Nanotextured titanium surfaces stimulate spreading, migration, and growth of rat mast cells. **J Biomed Mater Res A**, v. 105, p. 2150–2161, 2017.

MAXIMIANO, W.M.A.; DA SILVA, E.Z.M.; SANTANA, A.C.; DE OLIVEIRA, P.T.; JAMUR, M.C.; OLIVER, C. Mast Cell Mediators Inhibit Osteoblastic Differentiation and Extracellular Matrix Mineralization. **J Histochem Cytochem**, v. 65, p. 723–741, 2017.

MCMANUS, A.J.; DOREMUS, R.H.; SIEGEL, R.W.; BIZIOS, R. Evaluation of cytocompatibility and bending modulus of nanoceramic/polymer composites. **J Biomed Mater Res A**, v. 72, p. 98–106, 2005.

MCWHORTER, F.Y.; WANG, T.; NGUYEN, P.; CHUNG, T.; LIU, W.F. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, p. 17253–17258, 2013.

MENDONÇA, G.; MENDONÇA, D.B.; ARAGÃO, F.J.; COOPER, L.F. Advancing dental implant surface technology from micron to nanotopography. **Biomaterials**, v. 29, p. 3822–3835, 2008.

MUÑOZ, J.; AKHAVAN, N.S.; MULLINS, A.P.; ARJMANDI, B.H. Macrophage Polarization and Osteoporosis: A Review. **Nutrients**, v. 12, p. 2999, 2020.

NASCIMENTO, M.H.M.; PELEGRINO, M.T.; PIERETTI, J.C.; SEABRA, A.B. How can nitric oxide help osteogenesis? **AIMS Mol Sci**, v. 7, p. 29–48, 2020.

NIU, Y.; WANG, Z.; SHI, Y.; DONG, L.; WANG, C. Modulating macrophage activities to promote endogenous bone regeneration: Biological mechanisms and engineering approaches. **Bioact Mater**, v. 6, p. 244–261, 2020.

ORECCHIONI, M.; GHOSHEH, Y.; PRAMOD, A.B.; LEY, K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. **Front Immunol**, v. 10, p. 1084, 2019.

OVERMAN, A.; BUMRUNGPET, A.; KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; CHUANG, C.C.; WEST, T.; DAWSON, B.; JIA, W.; MCINTOSH, M. Polyphenol-rich grape powder extract (GPE) attenuates inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. **Int J Obes**, v. 34, p. 800–808, 2010.

PEI, Y.; MENG, X.W.; ZHOU, X.Y.; XING, X.P.; XIA, W.B. Expression of core binding factor alpha1 up-regulated by IGF-I, GM-CSF, and EGF through MAPK pathway in MC3T3-E1 and C2C12 cells. **Acta Pharmacol Sin**, v. 24, p. 975–984, 2003.

PEREIRA, K.K.; ALVES, O.C.; NOVAES, A.B. Jr; DE OLIVEIRA, F.S.; YI, J.H.; ZANIQUELLI, O.; WOLF-BRANDSTETTER, C.; SCHARNWEBER, D.; VARIOLA, F.; NANJI, A.; ROSA, A.L.; DE OLIVEIRA, P.T. Progression of osteogenic cell cultures grown on microtopographic titanium coated with calcium phosphate and functionalized with a type I collagen-derived peptide. **J Periodontol**, v. 84, p. 1199–1210, 2013.

PIRRACO, R.P.; CERQUEIRA, M.T.; REIS, R.L.; MARQUES, A.P. Fibroblasts regulate osteoblasts through gap junctional communication. **Cytotherapy**, v. 14, p. 1276–1287, 2012.

POSTIGLIONE, L.; DOMENICO, G.D.; MONTAGNANI, S.; SPIGNA, G.D.; SALZANO, S.; CASTALDO, C.; RAMAGLIA, L.; SBORDONE, L.; ROSSI, G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces the osteoblastic differentiation of the human osteosarcoma cell line SaOS-2. **Calcif Tissue Int**, v. 72, p. 85–97, 2003.

ROY, M.; POMPELLA, A.; KUBACKI, J.; SZADE, J.; ROY, R.A.; HEDZELEK, W. Photofunctionalization of Titanium: An Alternative Explanation of Its Chemical-Physical Mechanism. **PLoS One**, v. 11, p. e0157481, 2016.

RICCUCCI, G.; CAZZOLA, M.; FERRARIS, S.; GOBBO, V. A.; GUAITA, M.; SPRIANO, S. Surface functionalization of Ti6Al4V with an extract of polyphenols from red grape pomace. **Mater Des**, v. 206, p. 109776, 2021.

SCANNAVINO, R.C.P. Funcionalização de nanotopografia de titânio com extrato de bagaço de uva: caracterização de superfície e efeitos sobre a diferenciação osteogênica *in vitro*. Paulo Tambasco de Oliveira. 2021. 71p. Dissertação (mestrado) – Mestrado em Odontologia (Periodontia), Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial e Periodontia, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 2021.



SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol**, v. 7, p. 3, 2006.

SHAVANDI, A.; BEKHIT, A.E.A.; SAEEDI, P.; IZADIFAR, Z.; BEKHIT, A.A.; KHADEMHOSEINI, A. Polyphenol uses in biomaterials engineering. **Biomaterials**, v. 167, p. 91–106, 2018.

SMEETS, R.; STADLINGER, B.; SCHWARZ, F.; BECK-BROICHSITTER, B.; JUNG, O.; PRECHT C.; KLOSS, F.; GRÖBE, A.; HEILAND, M.; EBKER, T. Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 6285620, 2016.

SPRIANO, S.; VERNE, E.; FERRARIS, S. Multifunctional titanium surfaces for bone integration. Patent no. EP2214732 (TO2007A000719).

TACIAK, B.; BIAŁASEK, M.; BRANIEWSKA, A.; SAS, Z.; SAWICKA, P.; KIRAGA, Ł.; RYGIEL, T.; KRÓL, M. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. **PLoS One**, v. 13, p. e0198943, 2018.

TANG, C.; LIANG, D.; QIU, Y.; ZHU, J.; TANG, G. Omentin-1 induces osteoblast viability and differentiation via the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in osteoporosis. **Mol Med Rep**, v. 25, p. 132, 2022.

TORRE, E.; IVIGLIA, G.; CASSINELLI, C.; MORRA, M.; RUSSO, N. Polyphenols from grape pomace induce osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. **Int J Mol Med**, v. 45, p. 1721–1734, 2020.

VARIOLA, F.; BRUNSKI, J.B.; ORSINI, G.; TAMBASCO DE OLIVEIRA, P.; WAZEN, R.; NANCI, A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. **Nanoscale**, v. 3, p. 335–353, 2011.

WANG, I.E.; LU, H.H. Role of cell-cell interactions on the regeneration of soft tissue-to-bone interface. **2006 Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc**, p. 783–786, 2006.

WEBB, K.; HLADY, V.; TRESKO, P.A. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. **J Biomed Mater Res**, v. 41, p. 422–430, 1998.

YEON, J.T.; CHOI, S.W.; KIM, S.H. Arginase 1 is a negative regulator of osteoclast differentiation. **Amino Acids**, v. 48, p. 559–565, 2016.

YI, J.-H.; BERNARD, C.; VARIOLA, F.; ZALZAL, S.F.; WUEST, J.D.; ROSEI, F.; NANCI A. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. **Surf Sci**, v. 600, p. 4613–4621, 2006.

ZHU, H.; JIA, Z.; LI, Y.R. Nrf2 Signaling in Macrophages. **React Oxyg Species (Apex)**, v. 2, p. 417–420, 2016.

## 8 APÊNDICES

**APÊNDICE A** - Epifluorescência de culturas de células macrofágicas RAW 264.7 crescidas sobre poliestireno, em 72 h pós-plaqueamento, exibindo (A) células em repouso – fenótipo M0, (B) fenótipo pró-inflamatório M1, quando expostas previamente a 200 ng/mL de LPS por 6 h, e (C) fenótipo pró-reparo M2, quando expostas previamente a 40 ng/mL de IL-4 por 6 h. Fluorescência verde indica o citoesqueleto de actina e azul, os núcleos celulares. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

