UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da atividade osteogênica de superfícies de titânio revestidas com camadas de
lipídios e fosfato de cálcio**

Amanda Natalina de Faria

Ribeirão Preto - Brasil

2017

AMANDA NATALINA DE FARIA

**Avaliação da atividade osteogênica de superfícies de titânio revestidas com camadas de
lipídios e fosfato de cálcio**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área: Bioquímica.

Orientador: Pietro Ciancaglini

Co-orientadora: Ana Paula Ramos

Ribeirão Preto - Brasil

2017

Autorizo a reprodução e a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

de Faria, Amanda Natalina

Avaliação da atividade osteogênica de superfícies de titânio revestidas com camadas de lipídios e fosfato de cálcio. Ribeirão Preto, 2017.

133p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área: Bioquímica.

Orientador: Ciancaglini, Pietro.

Co-orientadora: Ramos, Ana Paula.

1. Mineralização; 2. Filmes de Langmuir-Blodgett; 3. Fosfolipídios; 4. Osteoblastos; 5. Coberturas de Ti; 6. Paratormônio.

DE FARIA, A. N. **Avaliação da atividade osteogênica de superfícies de titânio revestidas com camadas de lipídios e fosfato de cálcio.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Bioquímica.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Pedro Faria e Valdene Faria, ao meu orientador Pietro Ciancaglini e à minha coorientadora Ana Paula Ramos. Parafraseando Carl Sagan, diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com vocês.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos recebidas e lições aprendidas diariamente.

Aos meus pais Pedro e Valdene por estarem presentes em todos os momentos de luta, pela paciência, apoio e amor incondicional. AMO VOCÊS! E às minhas filhas Pitiquinha e Bibi por alegrarem nossa casa e nossos dias.

Ao Leandro Padua pelo companheirismo, compreensão, cuidado e amor que me fortaleceu a cada dia. E também à Evânia, Juraci e Raphael por estarem sempre presentes.

Ao meu orientador Pietro Ciancaglini pelos conhecimentos adquiridos, pela paciência, pelos puxões de orelha, ensinamentos e amizade. E também a todos do Laboratório de Sistemas Biomiméticos de Membranas que participaram destes 4 anos de pesquisa.

À Professora Ana Paula Ramos por me fazer perder o medo e entender a beleza da físico-química. Obrigada pela coorientação e por todo o conhecimento compartilhado. Também agradeço a todos do Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Coloides pelas ajudas e colaborações.

Ao CNPq pela bolsa concedida e também à Capes e à FAPESP pelo financiamento.

A todos os professores e funcionários do Dpto. de Bioquímica da FMRP-USP e do Depto. de Química da FFCLRP-USP que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos que enfrentaram meu “sumiço” nas épocas difíceis, mas que não desistiram de mim.

Meu mais sincero Obrigada!

“Tempo virá em que uma pesquisa diligente e contínua esclarecerá aspectos que agora permanecem escondidos. O espaço de tempo de uma vida, mesmo se inteiramente devotada ao estudo do céu, não seria suficiente para investigar um objetivo tão vasto... Este conhecimento será conseguido somente através de gerações sucessivas.

Tempo virá em que os nossos descendentes ficarão admirados de que não soubéssemos particularidades tão óbvias a eles... Muitas descobertas estão reservadas para os que virão, quando a lembrança de nós estará apagada. O nosso universo será um assunto sem importância, a menos que haja alguma coisa nele a ser investigada a cada geração... A natureza não revela seus mistérios de uma só vez”.

Sêneca - Problemas Naturais,

Livro 7, Século I

RESUMO

&

ABSTRACT

RESUMO

DE FARIA, A. N. **Avaliação da atividade osteogênica de superfícies de titânio revestidas com camadas de lipídios e fosfato de cálcio.** Ribeirão Preto, 2017.

As coberturas de hidroxiapatita (HAp) são utilizadas para aumentar a osteointegração em implantes de titânio (Ti), devido à sua capacidade de promover a biomineralização para corrigir defeitos esqueléticos e craniofaciais. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência dos revestimentos sobre culturas primárias de osteoblastos. Na primeira fase de estudos, desenvolvemos uma nova abordagem de revestimento baseada em filmes Langmuir-Blodgett (LB) de dihexadecilfosfato (DHP) e ácido octadecilfosfônico (OPA) depositados em discos Ti, e crescimento subsequente de cristais de HAp. Analisamos a viabilidade dos osteoblastos, a atividade da fosfatase alcalina (ALP) e a formação da matriz mineralizada por métodos colorimétricos e a morfologia das culturas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal. Os resultados revelaram que o revestimento DHP/HAp aumentou a viabilidade dos osteoblastos até 150% em comparação com o controle em todos os dias testados. O revestimento OPA/HAp promoveu a maior viabilidade ao 14 dias (190%). A atividade de ALP foi aumentada apenas pelo revestimento de DHP/HAp ao 14º dia em comparação com o controle e Ti limpo. A microscopia eletrônica de varredura e as microfotografias confocais revelaram diferenças morfológicas entre os osteoblastos cultivados em ambos os revestimentos, aumentando o seu número e o espalhamento. O revestimento de DHP/HAp aumentou a produção de nódulos biomineralizados. O ensaio de biomineralização pela técnica do Vermelho de Alizarina mostrou que o revestimento de OPA/HAp possuía uma concentração de cálcio (Ca^{2+}) 1,88 vezes superior à cobertura de DHP/HAp. Uma vez que a literatura relata que o Ca^{2+} pode estimular ou inibir a atividade da ALP e, consequentemente, o processo de biomineralização, as diferenças no comportamento desses dois revestimentos podem estar relacionadas às diferenças de concentração de superfície de Ca^{2+} . O bom

desempenho do revestimento de DHP/HAp pode estar relacionado às características da composição química, adicionada à técnica de deposição LB.

Na segunda fase da pesquisa, as monocamadas de Langmuir de DHP e dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) foram testadas e utilizadas para incorporar o paratormônio 1-34 (PTH 1-34) (DHP/Ca+PTH e DPPC/Ca+PTH, respectivamente). Também foram testadas as ações dos revestimentos DHP/HAp com PTH em solução (DHP/HAp+PTH S) e gotejado (DHP/HAp+PTH G) em culturas de osteoblastos. Um potencial zeta negativo em pH 7,4 foi encontrado (-14,9 mV) para o PTH 1-34. A isoterma de DPPC mostrou um aumento da área mínima ocupada por molécula lipídica após a injeção de PTH na subfase de água (50 μ L de solução 0,5 mg/mL) em 10,97 $\text{\AA}^2$, o que pode ser devido à inserção de PTH neste filme. A área mínima de DHP foi alterada em 2,3 $\text{\AA}^2$, o que não é estatisticamente significativo. A análise de QCM mostrou um depósito de 72,5 ng de PTH em filme de DPPC e 29,3 ng de PTH em filme de DHP para cada 25 μ g de PTH injetado na cuba de Langmuir. A viabilidade celular e a formação da matriz mineralizada de culturas de osteoblastos crescidas em DHP/Ca+PTH e revestimentos DPPC/Ca+PTH diminuíram quando comparadas com Ti limpo.

Os revestimentos DHP/HAp+PTH S e DHP/HAp+PTH G mostraram ser tão eficientes quanto o Ti DHP/HAp para estimular o processo de biomineralização. Mas a cobertura de DHP/HAp+PTH G aumentou a viabilidade dos osteoblastos e a formação de matriz mineralizada quando comparada com Ti DHP/HAp. Esta é uma cobertura inovadora que abre precedentes para o uso da técnica de gotejamento em HAp para outros hormônios e drogas que agem sobre o tecido ósseo.

Palavras-chave: Mineralização; filmes de Langmuir-Blodgett; Fosfolipídios, Osteoblastos, coberturas de Ti, OPA, DHP, DPPC, paratormônio

ABSTRACT

DE FARIA, A. N. **Evaluation of the osteogenic activity of titanium surfaces coated with lipids layers and calcium phosphate.** Ribeirão Preto, 2017.

Due to their ability to promote biomineralization, Hydroxyapatite (HAp) coatings are used to increase the osteointegration in titanium (Ti) implants, in order to correct skeletal and craniofacial defects. The objective of the research was to evaluate the influence of the coatings on osteoblasts primary cultures. In the first phase of the research we developed a new coating approach based on Langmuir-Blodgett (LB) films of dihexadecyl phosphate (DHP) and octadecylphosphonic acid (OPA) deposited on Ti discs and subsequent growth of HAp crystals. We analyzed the osteoblast viability, alkaline phosphatase (ALP) activity and mineralized matrix formation by colorimetric methods, and the morphology of the cultures by scanning electron microscopy and confocal micrographies. The results revealed that the DHP/HAp coating increased osteoblast viability up to 150% compared to the control at all days tested. The OPA/HAp coating promoted the highest viability on the 14th day (190%). The ALP activity was enhanced only by the DHP/HAp coating on the 14th day compared to control, and clean Ti. To explore the morphology of the cells, the scanning electron microscopy and confocal micrographies were obtained, and revealed morphological differences between osteoblasts grown on both coated Ti compared to clean Ti. Both coatings increased the number and spreading of osteoblasts, while the DHP/HAp coating enhanced the production of biomineralized nodules. The Alizarin Red assay showed that OPA/HAp coating has 1.88 times higher calcium (Ca^{2+}) concentration than DHP/HAp. The same test confirmed the increase of mineralization only by DHP/HAp coating compared to clean Ti. Since literature reports that Ca^{2+} can stimulate or inhibit the ALP activity and consequently, the biomineralization process, the differences on the behavior of these two coatings could be related to the Ca^{2+} surface concentration differences. The good performance of the DHP/HAp

coating can be explained due to the characteristics of the chemical composition, added to the LB deposition technique.

In the second phase of the research, Langmuir monolayers of DHP and dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) was tested and used to incorporate 1-34 parathyroid hormone (PTH 1-34) (DHP/Ca+PTH, and DPPC/Ca+PTH, respectively). DHP/HAp coatings with PTH in solution (DHP/HAp+PTH S), and dropped (DHP/HAp+PTH G) also were tested on osteoblasts cultures. A negative zeta-potential at pH 7.4 was found (-14.9 mV) to PTH 1-34. The Langmuir isotherm of DPPC showed an increase of the minimum area occupied per lipid molecule after the PTH injection into the water subphase (50 μ L of 0.5 mg/mL solution) by 10.97 $\text{\AA}^2$, which could be due to the insertion of PTH in this film. The DHP minimum area changed by 2.3 $\text{\AA}^2$, which is not statistically significant. The QCM analysis showed the deposit of 72.5 ng of PTH on DPPC film, and 29.3 ng of PTH on DHP film for each 25 μ g of PTH injected into the Langmuir trough. The cell viability and matrix mineralization of osteoblasts cultures grown on DHP/Ca+PTH, and DPPC/Ca+PTH coatings decreased when compared to clean Ti.

DHP/HAp+PTH S and DHP/HAp+PTH G coatings proved to be as efficient as Ti DHP/HAp to stimulate the biomineralization process. But DHP/HAp+PTH G increased the osteoblast viability and formation of mineralized matrix when compared to Ti DHP/HAp. This is an innovative coating that sets the precedent for the use of the drip technique on HAp for other hormones and drugs that act on bone tissue.

Key Words: Mineralization; Langmuir-Blodgett film; Phospholipids, Osteoblast, Ti coating, OPA, DHP, DPPC, parathyroid hormone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática de uma cuba de Langmuir	12
Figura 2.	Isoterma π X A, evidenciando os diferentes estados de compactação da monocamada	13
Figura 3.	Esquema de transferência de monocamadas para um suporte sólido formando os filmes LB	15
Figura 4.	Morfologia dos diferentes tipos de filmes LB	16
Figura 5.	Estrutura primária do PTH humano	21
Figura 6.	Estruturas da molécula de OPA e da molécula de DHP	27
Figura 7.	Representação esquemática da estrutura da dupla camada elétrica	34
Figura 8.	Cristal piezoelétrico de quartzo	35
Figura 9.	Isotermas de pressão de superfície vs área por molécula obtidas sobre água pura e em subfase de CaCl_2	40
Figura 10.	Representação esquemática das coberturas de OPA/HAp e DHP/HAp sobre o Ti	41
Figura 11.	Viabilidade celular de osteoblastos crescidos sobre o CT, Ti, Ti+OPA/HAp, Ti+DHP/HAp	44
Figura 12.	Dosagem de proteína total de osteoblastos crescidos sobre o CT, Ti,	

	Ti+OPA/HAp, Ti+DHP/HAp _____	47
Figura 13.	Dosagem da concentração de colágeno de osteoblastos crescidos sobre o CT, Ti, Ti+OPA/HAp, Ti+DHP/HAp _____	50
Figura 14.	Atividade da fosfatase alcalina dos osteoblastos crescidos sobre o CT, Ti, Ti+OPA/HAp, Ti+DHP/HAp _____	54
Figura 15.	Formação da matriz mineralizada de cultura de osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti+OPA/HAp, Ti+DHP/HAp _____	57
Figura 16.	Análise por EDX das superfícies mineralizadas de Ti, Ti+OPA/HAp, Ti+DHP/HAp _____	58
Figura 17.	Microscopia eletrônica de varredura de culturas de osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti+OPA/HAp, Ti+DHP/HAp _____	62
Figura 18.	Imagens de microscopia confocal das culturas de osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti+OPA/HAp, Ti+DHP/HAp _____	65
SEGUNDA PARTE DA TESE		
Figura 19.	a) Isoterma de π vs área por molécula de DPPC e DPPC PTH. b) Módulo compressional (C_s^{-1}) do DPPC e DPPC PTH _____	69
Figura 20.	a) Isoterma de π vs área por molécula de DHP e DHP PTH. b) Módulo compressional (C_s^{-1}) do DHP e DHP PTH _____	70
Figura 21.	Viabilidade celular de osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti/DHP, Ti/DHP+PTH, Ti/DPPC, Ti/DPPC+PTH _____	73

Figura 22.	Formação da matriz mineralizada de cultura de osteoblastos sobre o Ti, Ti/DHP, Ti/DHP+PTH, Ti/DPPC, Ti/DPPC+PTH _____	77
Figura 23.	Viabilidade celular de osteoblastos cultivados com diferentes concentrações de PTH _____	82
Figura 24.	Viabilidade celular de osteoblastos crescidos sobre o CT, PTH, Ti, Ti PTH _____	83
Figura 25.	Dosagem de proteína total de osteoblastos crescidos sobre o CT, PTH, Ti, Ti PTH _____	86
Figura 26.	Dosagem da concentração de colágeno de osteoblastos crescidos sobre o CT, PTH, Ti, Ti PTH _____	87
Figura 27.	Atividade da fosfatase alcalina dos osteoblastos crescidos sobre o CT, PTH, Ti, Ti PTH _____	88
Figura 28.	Formação da matriz mineralizada de cultura de osteoblastos crescidos sobre o CT, PTH, Ti, Ti PTH _____	91
Figura 29.	Espectro de absorção no infravermelho da amostra de osso humano ____	93
Figura 30.	Espectro de absorção no infravermelho da amostra de Ti recoberto com DHP/HAp e DHP/HAp+PTH _____	94
Figura 31.	Viabilidade celular de osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G, Ti HAp/PTH S _____	96
Figura 32.	Dosagem de proteína total de osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti DHP/HAp,	

	Ti HAp/PTH G, Ti HAp/PTH S _____	99
Figura 33.	Dosagem da concentração de colágeno de osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G, Ti HAp/PTH S _____	100
Figura 34.	Atividade da fosfatase alcalina dos osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G, Ti HAp/PTH S _____	101
Figura 35.	Formação da matriz mineralizada de cultura de osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G, Ti HAp/PTH S _____	103
Figura 36.	Microscopia eletrônica de varredura dos nódulos minerais das culturas de osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G _____	105
Figura 37.	Análise por EDX das superfícies mineralizadas sobre o Ti, Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G _____	106
Figura 38.	Imagens de microscopia confocal das culturas de osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G _____	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores típicos de C_s^{-1} para diferentes estados da monocamada	14
Tabela 2.	Fosfatos de cálcio, fórmulas químicas e razão Ca/P	18
Tabela 3.	Parâmetros comparativos das coberturas de Ti+DHP/HAp e Ti+OPA/HAp	39
Tabela 4.	Médias das massas dos fosfolipídios DHP e DPPC e do PTH depositados em cristal piezoelétrico de quartzo	71

ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
AMPOL	2-amino-2-metil-propan-1-ol
ANOVA	Análise de variância
ATR	Reflexão total atenuada
BSA	Soroalbumina bovina
Ca/P	Razão cálcio e fósforo
cAMP	AMP cíclico
Col	Colágeno
Col1 α 1	Colágeno tipo 1 α 1
CT	Controle
DHP	Diexadecil fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPC	Dipalmitoil fosfatidilcolina
EDX	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X
FBS	Soro fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
GLA	Ácido gama-carboxiglutâmico
HAp	Hidroxiapatita
HAp _m	Hidroxiapatita moldada
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LB	Langmuir-Blodgett
LC	Líquido-condensado
LE	Líquido-expandido

M	Molar
MC	Microscopia confocal
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium
MVs	Vesículas da matiz
OPA	Ácido octadecilfosfônico
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	proteína kinase A
PLLA	Ácido poli-L láctico
PNF ⁻	íon p-nitrofenolato
PNFF	p-nitrofenilfosfato
PTH	Paratormônio
PTH 1-34	Paratormônio fragmento 1-34
PTH G	Paratormônio 1-34 gotejado
PTH S	Paratormônio 1-34 em solução
QCM	Microbalança de cristal de quartzo
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
RNA	Ácido ribonucleico
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SBF	Fluido corpóreo simulado
T	Temperatura
Ti	Titânio
TNAP	Fosfatase alcalina tecido não-específica
α -MEM	Meio essencial mínimo com modificação α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	06
2.1 Biomateriais	07
2.2 Monocamadas de Langmuir e Filmes LB	11
2.3 O fenômeno da osteointegração e regeneração óssea	16
2.4 O tecido ósseo e a biomineralização	17
2.5 Relação dos fosfolipídios e a biomineralização	19
2.6 Atuação do paratormônio no tecido ósseo	20
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivos gerais	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Materiais	26
4.2 Solução de SBF	26
4.3 Recobrimento por filmes LB	26
4.4 Linhagem celular	28
4.5 Isolamento, cultura e diferenciação de células mesenquimais estromais de ratos	28
4.6 Contagem das células com Azul de Tripán	29
4.7 Ensaio de viabilidade celular pela metodologia do MTT	30
4.8 Dosagem de proteína total	30
4.9 Determinação da concentração de colágeno	31
4.10 Determinação da atividade da fosfatase alcalina	31
4.11 Preparação das frações de membrana ricas em fosfatase alcalina	31
4.12 Avaliação da formação de matriz mineralizada	32

4.13 Morfologia, adesão e proliferação dos osteoblastos _____	32
CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PRODUZIDOS NA SEGUNDA FASE DE EXPERIMENTOS DA TESE _____	33
4.14 Potencial Zeta do PTH _____	33
4.15 Microbalança a cristal de quartzo (QCM) _____	34
4.16 Espectroscopia de Infravermelho _____	35
4.17 Análises estatísticas _____	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	37
5.1 1ª FASE DE EXPERIMENTOS _____	38
5.1.1 Isotermas de OPA e DHP _____	39
5.1.2 Monocamadas de Langmuir e coberturas de DHP/HAP e OPA/HAP _	40
5.1.3 Viabilidade celular _____	42
5.1.4 Dosagem de proteína total _____	45
5.1.5 Determinação da concentração de colágeno _____	48
5.1.6 Atividade da fosfatase alcalina _____	51
5.1.7 Avaliação da formação de matriz mineralizada e EDX _____	55
5.1.8 Microscopia eletrônica de varredura _____	59
5.1.9 Microscopia confocal _____	63
5.2 2ª FASE DE EXPERIMENTOS _____	66
<i>OSTEOBLASTOS CRESCIDOS SOBRE COBERTURAS DE LIPÍDIOS, HAP E PTH</i> _____	66
5.2.1 Isoterma de π vs área por molécula e módulo compressional (Cs^{-1}) ____	66
5.2.2 Microbalança de cristal de quartzo _____	71
5.2.3 Viabilidade celular dos osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti DPPC, Ti DHP _____	72

5.2.4 Formação da matriz mineralizada dos osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti DPPC, Ti DHP _____	75
<i>ATUAÇÃO DO PTH NOS OSTEOLASTOS CRESCIDOS SOBRE A PLACA DE CULTURA E TI</i> _____	79
5.2.5 Viabilidade celular _____	79
5.2.6 Dosagem de proteína total, da concentração de colágeno e atividade da ALP _____	84
5.2.7 Formação da matriz mineralizada _____	89
<i>UTILIZAÇÃO DAS COBERTURAS DE TI+DHP/HAP COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE PTH</i> _____	92
5.2.8 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier _____	92
5.2.9 Viabilidade celular _____	95
5.2.10 Dosagem de proteína total, concentração de colágeno e atividade da ALP _____	97
5.2.11 Formação da matriz mineralizada _____	102
5.2.12 MEV e EDX _____	104
5.2.13 Microscopia confocal _____	107
6. CONCLUSÕES _____	110
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	112
8. ANEXOS _____	124
8.1 Protocolo para o uso de animais em experimentação _____	125
8.2 Artigos publicados durante o período do Doutorado _____	126

1. INTRODUÇÃO

A substituição de dentes e ossos por biomateriais é realizada para a recuperação da funcionalidade do tecido afetado. Destes biomateriais, a literatura aponta o titânio (Ti) como o mais utilizado pelas suas características físico-químicas e estabilidade. Atualmente, há um crescimento da busca por novos biomateriais ou desenvolvimento de técnicas que melhorem as características dos já existentes, como a biocompatibilidade, resistência à corrosão e ao desgaste e baixa toxicidade (KULKARNI et al., 2014). Os biomateriais utilizados para implantes de substituição óssea almejam mimetizar ou reproduzir a estrutura do tecido ósseo, tendo como finalidade, a sua integração efetiva com o organismo hospedeiro. Devido ao tecido ósseo ser constituído por interações entre componentes orgânicos e inorgânicos (BOSKEY, 2013; OLSZTA et al., 2007), existe a possibilidade de construção de biomateriais organizados nanometricamente que simulem a sua composição.

A produção de alguns biomateriais utilizam técnicas que visam recobrir um suporte metálico com uma camada de hidroxiapatita (HAp) similar à encontrada no tecido ósseo, utilizando-se da técnica de Langmuir-Blodgett (LB), compostos por filmes de tensoativos insolúveis (CRUZ et al., 2016; DE SOUZA et al., 2014). Esta é uma metodologia pouco explorada, cujos trabalhos já publicados são promissores.

Na segunda parte do estudo, foi utilizado o fragmento 1-34 do paratormônio (PTH 1-34) para mimetrizar o efeito do PTH inteiro. Este hormônio tem capacidade de interagir com o sistema ósseo, através de receptores presentes nos osteoblastos. O PTH é composto por 84 aminoácidos, possui a função de regular a homeostase do cálcio pela ação em tecidos específicos; mantém as concentrações de cálcio séricas dentro dos limites fisiológicos por ações diretas nos tecidos ósseos, renais, e indiretamente no trato intestinal, via 1,25-diidroxi vitamina D (FITZPATRICK; BILEZIKIAN, 2006).

No tecido ósseo, a literatura cita diferentes respostas ao uso intermitente ou contínuo do PTH, mostrando a importância de seu estudo clínico e terapêutico (BELCHETZ et al., 1978; BELLIDO et al., 2003). A elevação crônica deste hormônio, como no hiperparatireoidismo primário ou secundário estimula a reabsorção, levando à perda de massa óssea (HORWITZ et al., 2011; SLATOPOLSKY; DUSSO; BROWN, 1999). Em contraste, a administração intermitente do PTH estimula a formação de tecido ósseo novo (BELLIDO et al., 2003; JILKA et al., 2009).

A administração intermitente deste hormônio em injeções diárias é o único tratamento anabólico antiosteoporótico aprovado pela Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (*United States Food and Drug Administration – FDA*) (DANG et al., 2017), sendo a primeira terapia contra a osteoporose que aumenta comprovadamente a massa óssea, reverte o déficit ósseo e reduz o número de fraturas (BELLIDO et al., 2003; NEER et al., 2001). Injeções diárias tanto do fragmento 1-34 quanto da proteína inteira (1-84) mostraram estes efeitos tanto em mulheres após a menopausa, quanto em homens idosos e mulheres com osteoporose induzida por glicocorticóides (HODSMAN et al., 2005; JILKA, 2007).

Os diferentes efeitos da administração do PTH em camundongos e ratos foram extensivamente mostrados. Estudo *in vivo* conduzido por Jilka e colaboradores mostraram que injeções de PTH ocorridas diariamente em camundongos por 28 dias reduziu a apoptose e aumentou o número de osteoblastos (JILKA et al., 1999). Já o estudo conduzido por Bellido et al. (2003) mostrou que em ratos, a elevação continuada do PTH estimula a osteoclastogênese, e que o seu efeito antiapoptótico necessita da transcrição de genes de sobrevivência (como o *Bel-2*) mediada pelo fator de transcrição *Runx2*.

Vários estudos tem sido conduzidos para investigar o mecanismo de ação do PTH na proliferação e na diferenciação de osteoblastos, utilizando vários modelos de culturas *in vitro*.

No entanto, os resultados obtidos sobre o mecanismo de ação da exposição contínua ou transiente do PTH neste tecido não levam a uma conclusão completamente consistente. Sendo que há diferenças de resultados também acerca dos tipos de células utilizadas (ISHIZUYA et al., 1997). Como exemplo podemos citar que o PTH estimula a proliferação de células osteoblásticas isoladas de trabéculas humanas (MACDONALD; GALLAGHER; RUSSELL, 1986), de calvária de aves (SCUTT et al., 1994), e doses de 50 ng/mL do fragmento 1-34 de PTH em exposição intermitente estimularam a diferenciação e proliferação de células primárias osteoblásticas isoladas da calvária de ratos recém-nascidos (ISHIZUYA et al., 1997). No entanto, inibiu a proliferação da linhagem osteoblástica UMR-106 (KANO et al., 2009; PARTRIDGE et al., 1985) e a atividade da ALP de células osteoblásticas da linhagem ROS-17/2.8 (MAJESKA; RODAN, 1982).

Ainda há poucos trabalhos na literatura sobre materiais para liberação de PTH. Novos estudos mostraram o desenvolvimento de um biomaterial para a promoção da regeneração óssea, pela liberação pré-programada de PTH de forma pulsada ou contínua, de arcabouços 3D feitos de ácido poli-L láctico (PLLA) contendo a solução de PTH, camadas de selantes e camadas isolantes. Este biomaterial foi testado *in vivo* em um defeito local na calvária de camundongo, mostrando resultados satisfatórios de regeneração óssea para o arcabouço de liberação pulsada (DANG et al., 2017). AMERI e colaboradores (2009) desenvolveram um método de liberação transdérmica de PTH 1-34, capaz de penetrar a barreira da pele. O emplastro consiste em uma matriz de microprojecção de titânio (1300 microprojeções por 2 cm² e 190 µm de comprimento) ligados ao centro de um suporte adesivo. A ponta de cada microprojecção é revestida com a formulação do fármaco. Quando o emplastro é aplicado sobre a pele, as microprojeções revestidas com fármaco penetram através da camada superficial da barreira cutânea nas camadas epidérmicas/dérmicas (50-150 µm de

profundidade), onde a formulação do fármaco se dissolve rapidamente e é liberada na pele para absorção (AMERI; DADDONA; MAA, 2009).

O uso do titânio recoberto por HAp e filmes finos de lipídios como carreadores de PTH ainda foram muito pouco explorados na literatura, e nesta parte da pesquisa foi caracterizado e avaliado o uso deste sistema *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais

Os biomateriais são substâncias ou compostos utilizados na fabricação de implantes. São utilizados para tratar ou substituir tecidos ou órgãos que estejam com algum comprometimento da sua funcionalidade. Eles colaboram com a melhora da qualidade de vida e longevidade humana (AHERWAR; K SINGH; PATNAIK, 2015).

Há uma numerosa gama de biomateriais como por exemplo, os metais (aço inoxidável, ligas de cobalto, Ti e suas ligas), cerâmicas (óxido de alumínio, zircônia, fosfatos de cálcio), além de polímeros naturais e sintéticos (KULKARNI et al., 2014; MIHOV; KATERSKA, 2010). Os materiais metálicos tem sido bastante utilizados para aplicações médicas (na ortopedia ou dentística) por mais de 50 anos, por apresentar características que possibilitam sua função com a mínima reação adversa ao hospedeiro, como baixa toxicidade, não produzir atividade antigênica, não ser carcinogênico e/ou mutagênico e não produzir resposta adversa local ou sistêmica no organismo alvo (AHERWAR; K SINGH; PATNAIK, 2015; ZAVAGLIA; PRADO DA SILVA, 2016)

Entre os metais, o Ti e suas ligas são considerados os mais significativos, devido à sua resistência aos efeitos dos fluidos corpóreos, à tração e à corrosão, além de possuir baixa densidade, um preço relativamente baixo quando comparado a outros metais e uma combinação específica de força e biocompatibilidade (GENTLEMAN; POLAK, 2006; KULKARNI et al., 2014). O termo biocompatibilidade foi descrito por Williams como a habilidade do biomaterial de cumprir a função para que foi utilizado, sem desencadear nenhum efeito indesejável local ou sistêmico no beneficiário deste tratamento (KULKARNI et al., 2014; WILLIAMS, 2008).

Devido a possuir uma excelente resistência à corrosão, estes materiais são designados como bioestáveis ou bioinertes. Esta característica é devido à habilidade de formar uma camada protetora altamente aderente e contínua de óxido na sua superfície, considerada

quimicamente estável e de formação espontânea em contato com o ar ou meio oxidante, como no sistema biológico (AHERWAR; K SINGH; PATNAIK, 2015; LIU et al., 2011).

Contudo, a aplicação destes biomateriais inertes embora seja satisfatória, pode ocasionar uma diminuição da osteointegração (passo crucial para o sucesso dos implantes ósseos), levando a um encapsulamento fibroso na interface implante-osso. Representando assim, um fator limitante para a sua utilização (WANG, 2016).

Atualmente são empregados diversos métodos a fim de modificar a superfície do Ti, pela manipulação da topografia, da molhabilidade, da carga e da composição química entre outros, a fim de melhorar a adesão tecidual, a osteointegração e a formação do novo tecido ósseo (CROSS et al., 2016). Estas modificações podem ser realizadas baseados em métodos químicos, físicos, ou pela combinação deles (KULKARNI et al., 2014; PUCKETT et al., 2010) como por exemplo, métodos que levem à uma alteração na rugosidade superficial, podendo ser acompanhada da adição de materiais bioativos na superfície (DE SOUZA et al., 2014).

Os métodos químicos tem como principal objetivo o aumento da biocompatibilidade, bioatividade, resistência à corrosão e remoção de contaminantes. Estes métodos promovem a produção de metais com superfícies bioativas. As técnicas mais comumente utilizadas para este fim são o tratamento ácido (MAINIER et al., 2013), tratamento básico (BHOLA et al., 2011), anodização eletroquímica (WU et al., 2014), deposição sol-gel (ADVINCULA et al., 2005), tratamento com peróxido de hidrogênio (MOHAJERI; HAGHSHENAS, 2016), deposição por vapor químico (JANUS' et al., 2013) e métodos bioquímicos de recobrimento de superfícies (HAYAKAWA, 2015; MAO, 2014). Tanto as reações químicas, eletroquímicas e bioquímicas ocorrem somente na interface entre o Ti e a solução (KULKARNI et al., 2014).

A utilização de métodos físicos incluem processos como cobertura por spray térmico (GARDON; GUILMANY, 2014), deposição física por vapor (YARLAGADDA et al.,

2014), tratamento por plasma de descarga luminescente (HUANG et al., 2011) e deposição de filmes LB (CRUZ et al., 2016; DE SOUZA et al., 2014). Nos métodos físicos não ocorrem reações químicas na interface (KULKARNI et al., 2014).

Quando utilizadas em implantes de Ti e em suas ligas, as modificações na superfície podem atuar tanto na diferenciação e implantação dos osteoblastos, quanto podem modificar a concentração de matriz óssea na superfície do implante (AHERWAR; K SINGH; PATNAIK, 2015; CROSS et al., 2016). Modificações na sua topografia (caracterizada pela rugosidade e área superficial em níveis nano ou micrométricos) podem afetar a adesão, a proliferação dos osteoblastos nos implantes e a síntese de colágeno (LI et al., 2014; WANG, 2016). Também foi comprovado que em superfícies rugosas a osteogênese inicia-se mais rapidamente quando comparados às superfícies lisas, e há um aumento da quantidade de tecido ósseo diretamente em contato com a sua superfície (GRIZON et al., 2002; OFFERMANN et al., 2016; SMEETS et al., 2016).

Considerando as modificações possíveis na superfície do Ti, o aumento da hidrofilicidade resulta no aumento da biocompatibilidade do biomaterial, devido ao fato de influenciar no contato entre o meio fisiológico e o implante (HOU et al., 2015; KIRMANIDOU et al., 2016; YANG et al., 2016). A modificação da energia superficial também pode influenciar na adesão e proliferação de células, na adsorção de proteínas e na reatividade da superfície (GEETHA et al., 2009; GUO; MATINLINNA; TANG, 2012). Após a implantação do biomaterial ocorre a elevação da adsorção de proteínas, devido à interação seletiva das partes polares e apolares dos seus aminoácidos constituintes, sendo que a formação de uma camada de condicionamento é fundamental para uma resposta correta do corpo hospedeiro (KULKARNI et al., 2014). A ordem em que as proteínas ancoram na superfície do biomaterial é relevante, pois é determinado pela variação das componentes polares e dispersivas da energia livre superficial do material implantado (NOVAES et al.,

2010), sendo as superfícies mais polares melhores para a adesão e proliferação dos osteoblastos (GENTLEMAN; AND GENTLEMAN, 2014).

Outro fator importante envolvido na adesão e proliferação de um tecido ao redor do implante é a carga da superfície do biomaterial. Esta carga depende de fatores como a composição química da superfície, situação inflamatória do tecido adjacente, pH do meio, entre outros. Sendo que a adesão das membranas celulares, adsorção de proteínas, o formato das células aderidas e a carga superficial são influenciadas pela distribuição das cargas do biomaterial, possuindo grande importância para o controle da integração do implante ao sistema ósseo (GUO; MATINLINNA; TANG, 2012). Modificações de superfícies metálicas são empregadas a fim de elevar a afinidade por substâncias polares (LE GUÉHENNEC et al., 2007; ZHANG et al., 2005) e criar superfícies que possuam bioatividade, simulando a estrutura e composição do tecido ósseo.

O recobrimento do Ti com HAp é uma modificação que possui importância biológica, devido à similaridade do composto com a fase mineral encontrada nos ossos, o que pode aumentar a sua osseointegração (MANDRACCI et al., 2016; ŚWIECZKO – ŻUREK; BARTMAŃSKI, 2016). No entanto, o tempo elevado para a cristalização do fosfato de cálcio pelas técnicas mais comumente utilizadas e a obtenção de um recobrimento homogêneo são fatores limitantes deste processo (DE GROOT et al., 1987; OTSUKA; KAWAGUCHI; MUTOH, 2016). Uma das técnicas amplamente utilizada para recobrimento do Ti com HAp é o uso do spray por plasma, que resulta em uma rápida fixação (SINGH; SINGH; PRAKASH, 2011). No entanto há relatos de problemas como delaminação e debris associados a estas coberturas (OTSUKA; KAWAGUCHI; MUTOH, 2016), além do uso de altas temperaturas, equipamentos caros e não possuir um crescimento muito organizado (DE SOUZA et al., 2014; ONG et al., 2006).

Sendo assim, uma recente técnica que permite o crescimento de HAp guiada por

fosfolipídios na superfície do Ti, se mostra como uma estratégia eficaz. A técnica de produção de filmes LB para recobrimento do titânio com fosfolipídios, acoplada ao crescimento de minerais em sua superfície ainda é muito pouco utilizada. Nesta técnica, as matrizes orgânicas de filmes LB permitem a nucleação dos primeiros cristais, orientando em escala nanométrica este processo de crescimento mineral, além de serem biocompatíveis e constituídos por lípidos e proteínas, mimetizando a estrutura da parede celular (RAMOS; ESPIMPOLO; ZANIQUELLI, 2012; STOICA-GUZUN et al., 2012). Isto é possível, pois os lípidos podem ser adsorvidos sobre superfícies sólidas, como a superfície do Ti (GOLUB et al., 2013), permitindo o posterior crescimento dos cristais sem a perda da camada lipídica inicial.

A propagação dos cristais de HAp sobre as superfícies modificadas com fosfato de cálcio amorfo foi possível através da metodologia descrita por KOKUBO et al. (1990), DE SOUZA et al., (2014), OYANE et al. (2003) entre outros. Onde os cristais de fosfato de cálcio foram expostos a uma solução de fluido corporal simulado (SBF), que contém sais como NaHCO_3 , CaCl_2 , NaCl , KCl , MgCl_2 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e Na_2SO_4 em concentrações similares à composição do plasma sanguíneo humano (KOKUBO et al., 1990; OYANE et al., 2003). Estudos *in vitro* tem utilizado a exposição ao SBF para a formação de HAp *in vivo*, podendo auxiliar na escolha de biomateriais estimuladores da osteogênese (MA et al., 2003; TAKADAMA et al., 2001).

2.2 Monocamadas de Langmuir e Filmes LB

As tentativas de produzir filmes finos de moléculas orgânicas foram realizadas inicialmente por Irwing Langmuir (LANGMUIR, 1917). Estes finos filmes, chamados de monocamadas de Langmuir, são compostos por moléculas anfifílicas insolúveis organizadas na interface líquido/ar de uma Cuba de Langmuir. Estas moléculas, quando são dispostas sobre a subfase aquosa da cuba, tendem a espalhar-se pela superfície de forma que a porção

apolar da molécula esteja em contato com o ar e a sua porção polar esteja em contato com a água, formando uma camada monomolecular orientada na interface. Estas moléculas são chamadas de tensoativos, uma vez que modificam a tensão superficial (γ) do líquido.

A estrutura de uma Cuba de Langmuir (representada pela Figura 1) pode possuir de uma a duas barreiras móveis. Estas se movimentam para a redução da área ocupada por molécula e consequentemente, organizá-las na interface líquido-ar.

Figura 1: Representação esquemática de uma cuba de Langmuir

Quando um tensoativo é espalhado na cuba sobre uma solução aquosa de tensão superficial γ_0 , ocorre uma redução da γ , modificando a pressão da superfície (π), que é definida como a diferença entre a γ na ausência e presença da monocamada.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

Equação 1

Há a possibilidade de determinar a área ocupada por cada uma das moléculas conhecendo a concentração do tensoativo espalhado em determinada área. Pois à medida em que a barreira da cuba comprime a monocamada a uma temperatura constante, pode-se

determinar a variação de π em função da área ocupada por cada molécula, o que resulta na isoterma de π . Estados físicos bidimensionais diferentes resultam da compressão da monocamada, como mostrado Figura 2, a isoterma de pressão superficial.

A monocamada pode ser comprimida em diferentes graus, e estes são similares aos estados da matéria: gás, líquido e estado sólido.

Figura 2: Isotherma π X A , evidenciando os diferentes estados de compactação da monocamada

A compressibilidade isotérmica é calculada a partir da inclinação da curva $\pi - A$, sendo um importante parâmetro no estudo de monocamadas. Entretanto, é mais comum o uso do recíproco da compressibilidade quando as monocamadas são avaliadas. C_s^{-1} é chamado de módulo compressional e possui dimensão de mN/m:

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right) \quad \text{Equação 2}$$

O C_s^{-1} é considerado zero para uma superfície líquida na ausência de lipídios, sendo aumentado com a concentração de tensoativo. O módulo compressional é uma medida de elasticidade da monocamada, considerado de extrema importância no estudo da estabilidade e propriedades cinéticas dos filmes. Ele depende do estado de condensação da monocamada mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Valores típicos de C_s^{-1} para diferentes estados da monocamada (DAVIES; RIDEAL, 1963)

Monocamada	C_s^{-1} (mN/m)
Sem surfactante	0
Líquido-expandida	12,5 a 50
Líquido-condensada	100 a 250
Sólida	1000 a 2000

Um sistema biomimético muito utilizado para simular a estrutura e composição de membranas biológicas (FERREIRA et al., 2016), o efeito de íons específicos sobre as monocamadas (CASTILLO-SANTAELLA et al., 2016) e a adsorção de proteínas (DENNISON; HARRIS; PHOENIX, 2010; XUE et al., 2009) são as monocamadas de fosfolipídios em uma Cuba de Langmuir.

A emersão/imersão de suportes em uma monocamada no estado condensado ($\pi \sim 30$ mN/m), dão origem aos filmes LB (BLODGETT, 1935). A cada ciclo de emersão ou imersão pela interface da monocamada, há a deposição de uma camada de lipídeos dos dois lados do suporte sólido (Figura 3).

Figura 3: Esquema de transferência de monocamadas para um suporte sólido formando os filmes LB.

As multicamadas podem ser produzidas por passagens subsequentes do suporte sólido pela interface lipídica. Sendo que a espessura final do filme de multicamadas será o produto do número de ciclos de emersão/imersão do suporte pelo comprimento da molécula.

Há três diferentes tipos de filmes que podem ser produzidos dependendo da maneira de transferência da monocamada para o suporte sólido: Tipos Y, X ou Z. As suas diferenças baseiam-se em como as cabeças polares e as caudas apolares dos lipídios estão dispostas sobre o suporte. Dos três tipos, o mais comumente encontrado é o Y, devido à sua maior estabilidade quando comparado aos outros. Este padrão é obtido por emersão e imersão do suporte através da monocamada (Figura 4).

Figura 4: Morfologia dos diferentes tipos de filmes LB

Tanto as monocamadas de Langmuir, quanto os filmes LB possuem aplicações na fabricação de biosensores pelo recobrimento de materiais eletrônicos e na modificação de superfícies metálicas (CASELI et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2010; TORRANO et al., 2013), sendo que com a técnica de LB é possível a reconstrução de bicamadas lipídicas para modelos de estudos mais confiáveis.

2.3 O fenômeno da osteointegração e regeneração óssea

A busca da reabilitação dos pacientes através da regeneração correta de fraturas ósseas e reposição de tecidos perdidos tiveram um grande impulso a partir de 1950, com os estudos sobre a osteointegração realizado pelo Dr. Per I. Brånemark (BRÅNEMARK, 1983).

A osteointegração pode ser descrita como a capacidade de formação de tecidos ósseos normais sobre a superfície do biomaterial implantado e também de estabelecer uma interface capaz de suportar as cargas que naturalmente se formam no local da implantação. É caracterizada como a ligação direta (química e físico-química) do biomaterial ao osso sem a formação de uma camada fibrosa (WANG, 2016). A osteointegração permite a ancoragem dos implantes e a sua manutenção a longo prazo em condições que favoreçam a reabilitação

do paciente, a fim de promover a funcionalidade do osso.

Atualmente, os princípios da integração entre os ossos e os implantes descritos por Brånemark em 1983 ainda são seguidos: Primeiramente, o osso que irá receber o implante após a perfuração não é perfeitamente adequado a ele. O trauma causado pelas forças mecânicas e variação térmica durante a operação geram um hematoma, que é gradativamente transformado em um novo osso durante a cicatrização. Quando a cicatrização estiver completa, idealmente o novo osso deve estar em contato direto com a superfície do implante, sem o intermédio de tecido fibroso.

A integração do implante ao tecido ósseo pode ser facilitada pelas características específicas do biomaterial. Estas influenciarão diretamente na ancoragem e na proliferação dos osteoblastos, também na função das outras células do sistema ósseo (KOKUBO; YAMAGUCHI, 2016; LIU et al., 2011).

2.4 O tecido ósseo e a biomineralização

O tecido ósseo é um material heterogêneo constituído basicamente por uma fase mineral: a HAp (BOSKEY, 2007, 2013; OLSZTA et al., 2007) e uma fase orgânica, composta de cerca de 90% de colágeno tipo I, ~ 5% de proteínas não-colágenas, ~ 2% de lipídios, e água (BOSKEY, 2013).

A HAp ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) representa cerca de 60 a 70% da fase mineral óssea, sendo que esta variação está relacionada à localização, espécie e estágio de desenvolvimento ósseo (BOSKEY, 2013; COHEN et al., 2012). Esta fase do fosfato de cálcio é mais estável e menos solúvel nas condições ambientais, e possui razão molar Ca/P igual a 1,67 (Tabela 2). A formação das diversas fases de apatitas são determinadas pelas diferentes condições do meio (pH, temperatura) e também pela presença de impurezas.

Tabela 2: Fosfatos de cálcio, fórmulas químicas e razão Ca/P. Adaptado de GOMES et al., 2012.

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico (α , α' , β , γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio (α , β , γ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

No tecido ósseo, a HAp biológica contém uma variedade de traços de íons, como K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} , F^- , Sr^{2+} na sua rede cristalina. (CRUZ et al., 2016; OLSZTA et al., 2007).

O processo natural de biomineralização ocorre de maneiras diferentes quando mediado por osteoblastos, controblastos ou odontoblastos. A mineralização mediada por osteoblastos ocorre na formação dos ossos chatos e manutenção dos ossos longos. Este tecido ósseo é altamente dinâmico, com elevada atividade metabólica, elevado grau de rigidez e de resistência à pressão. A rigidez deve-se à sua matriz mineralizada, formada principalmente de colágeno tipo I ($\text{Coll}\alpha 1$), cálcio e fósforo na forma de cristais de HAp (BOSKEY, 2007, 2013). O tecido ósseo é constituído de diferentes tipos celulares, como osteoblastos, osteoclastos, células do sistema imune e osteócitos (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Os osteoblastos são as células especializadas na formação dos ossos, e são responsáveis pela produção da matriz, que posteriormente é mineralizada (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010). São células derivadas de células mesenquimais estromais (MSC), que

sofrem a diferenciação em osteoblastos após serem estimuladas a ativarem fatores de transcrição reguladores específicos (VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011). Possuem receptores para paratormônio, vitamina D3, glicocorticoides e estrógeno do tipo α e β , que estão envolvidos na regulação da diferenciação osteoblástica (YAMAGUCHI; KOMORI; SUDA, 2000). Estes hormônios são importantes para a manutenção da arquitetura do tecido ósseo e no desenvolvimento das células ósseas (BONNELLYE; AUBIN, 2005).

Entre as muitas substâncias produzidas pelos osteoblastos, pode-se citar a fosfatase alcalina (ALP), a osteoprotegerina, o ligante RANK (RANKL - *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand*), a proteína GLA (ácido carboxiglutâmico) e elevadas quantidades de Coll α 1, além de uma variedade de outras proteínas colágenas e não colágenas da matriz (BOSKEY, 2013; LIAN; STEIN, 2006). A ALP é encontrada em três diferentes isoformas: intestinal, placentária e do osso-fígado-rim. A isoforma presente no osso-fígado-rim pode ser encontrada em quase todos os tecidos, e por isso denominada como fosfatase alcalina tecido não-específica (TNAP), sendo encontrada em elevados níveis durante a mineralização do tecido ósseo, nas membranas dos osteoblastos (SIMÃO et al., 2010). A ALP catalisa uma reação de hidrólise em meio alcalino, gerando fosfato inorgânico posteriormente utilizado na fabricação dos cristais de HAp durante a mineralização (SIMÃO et al., 2007).

Há a presença de duas formas enzimáticas de ALP: uma associada à membrana celular e outra solúvel. No entanto, somente a forma ancorada à membrana pode ser associada ao processo de mineralização (LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1997; SAY et al., 1991). A quantificação dos níveis de ALP auxilia no monitoramento do processo de biomineralização, sendo considerado como um biomarcador fenotípico (GOLUB; BOESZE-BATTAGLIA, 2007; ROSA; BELOTI, 2005).

2.5 Relação dos fosfolipídios e a biomineralização

A formação da fase mineral óssea explora conjuntos de lipídios para controlar a localização, tamanho, composição e forma dos cristais de minerais. Fosfolipídios são comumente empregados no processo natural de biomineralização delineando compartimentos de reações nos quais a formação inicial do mineral acontece (COLLIER; MESSERSMITH, 2001).

Os vertebrados iniciam esta formação dentro de vesículas lipídicas e lipopeptídicas conhecidas como vesículas da matriz (MVs). Estas estão estruturadas na forma de bicamadas de 100-200 nm de diâmetro e são encontradas em certos tecidos mineralizados do corpo humano, sendo produzidos tanto por condroblastos, odontoblastos, e osteoblastos (COLLIER; MESSERSMITH, 2001; GOLUB, 2009). A sua composição é rica em fosfolipídios negativamente carregados (em pH fisiológico), canais iônicos, enzimas e proteínas de transporte (BOYAN et al., 1989; MARTÍN-MOLINA; RODRÍGUEZ-BEAS; FARAUDO, 2012). Alguns fosfolipídios podem atuar na regulação da biomineralização biológica, por regular o transporte de íons cálcio através da membrana e também promover a nucleação de HAp devido às suas interações com Ca^{2+} (BOSKEY, 1981; BOYAN et al., 1989). Estudos histoquímicos evidenciaram que elevados níveis de fosfatidilserina, fosfatidilcolina, esfingomiéline, colesterol e fosfatidiletanolamina podem ser encontrados nas membranas de osteoblastos, condroblastos e nas vesículas da matriz, participando assim dos processos de mineralização (GOLUB, 2009; ROBERTS et al., 2004; WUTHIER; LIPSCOMB, 2011).

2.6 Atuação do paratormônio no tecido ósseo

O PTH é um hormônio composto por 84 aminoácidos, responsável por regular a homeostase do cálcio pela ação em tecidos específicos. Ele mantém as concentrações de cálcio séricas dentro dos limites fisiológicos por ações diretas nos tecidos ósseos, renais, e

indiretamente no trato intestinal, via 1,25-diidroxi vitamina D (FITZPATRICK; BILEZIKIAN, 2006). A Figura 5 mostra a estrutura primária do PTH e a composição de aminoácidos.

Figura 5. Estrutura primária do PTH humano.

A literatura ainda não é totalmente conclusiva com o mecanismo de ação do PTH no sistema ósseo, mostrando tanto um efeito anabólico, quanto um efeito catabólico com variações da concentração e modo de exposição (FROLIK et al., 2003; ISHIZUYA et al., 1997). Alguns estudos clínicos mostraram que a administração intermitente do PTH é responsável pelo aumento da massa óssea (FROLIK et al., 2003; JILKA, 2007; JILKA et al.,

2009), principalmente na concentração de 50 ng/mL (ISHIZUYA et al., 1997; JILKA, 2007). Enquanto a infusão contínua deste hormônio a diminui a massa óssea pela estimulação da reabsorção, causando um aumento do cálcio sérico (HORWITZ et al., 2011; IIDA-KLEIN et al., 2005).

Estudos *in vitro* visam o esclarecimento dos efeitos pontuais do PTH nos diferentes tipos celulares do tecido ósseo, mas ainda existem muitas lacunas para serem respondidas. Sabe-se que as ações do PTH são mediadas por uma proteína G ligada a um receptor, chamado de PTH receptor 1 (PTHR1) (POTTS, 2005). O PTH ao se ligar ao PTHR1 estimula a ativação de várias vias de sinalização, entre elas, a via da adenilil ciclase mediada pela proteína G α s. Esta por sua vez estimula a produção de AMP cíclico (cAMP) e subsequentemente a produção da proteína kinase A (PKA) (JILKA, 2007). O PTH aumenta rapidamente a transcrição de RNA mensageiro de RUNX2 nos osteoblastos, ativa cascatas de sinalização envolvendo a ativação da PKA dependente de cAMP e mudanças na expressão de ciclinas (FITZPATRICK; BILEZIKIAN, 2006; QIN et al., 2005).

O tratamento para a osteoporose com PTH é eficaz e aprovado pelo FDA, com a administração diária de injeções por um período de no máximo 24 meses. No entanto, efeitos colaterais são relatados (CARBONE et al., 2017), como a desregulação dos níveis séricos deste hormônio, hipercalcemia, náuseas, tonturas e dor de cabeça (QUATTROCCHI; KOURLAS, 2004; SIKON; BATUR, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a resposta celular de osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio, modificadas com os lipídios DHP, OPA, DPPC, com HAp e PTH.

3.2 Objetivos específicos

A tese foi dividida em duas fases de experimentos:

a) Na primeira fase foram realizados testes avaliando as respostas celulares *in vitro* de osteoblastos crescidos sobre a superfície do titânio modificado pelo crescimento de cristais de HAp em filmes de DHP e em filmes de OPA, depositados pela técnica de filmes LB. Foram analisadas a viabilidade, proliferação, dosagem de proteína total, dosagem de colágeno, determinação da atividade da enzima fosfatase alcalina, formação da matriz mineralizada e a morfologia celular.

b) Na segunda fase de experimentos foram desenvolvidas as coberturas de Ti recoberto com filme de DHP/HAp com solução de PTH gotejado sobre a superfície (Ti HAp/PTH G), Ti recoberto com filme de DHP e solução de PTH sem crescimento de HAp (DHP/Ca+PTH), e Ti recoberto com filme de DPPC e solução de PTH sem crescimento de HAp (DPPC/Ca+PTH). Todos feitos pela deposição de filmes LB sobre a superfície de Ti. Posteriormente foram avaliadas as respostas celulares *in vitro* de culturas de osteoblastos crescidas sobre estas coberturas através da análise da viabilidade, proliferação, dosagem de proteína total, dosagem de colágeno, determinação da atividade da enzima fosfatase alcalina, formação da matriz mineralizada análise morfológica celular e dos nódulos de mineralização.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

3[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolium brometo (MTT), β -glicerofosfato, 2-amino-2-metil-propan-1-ol (AMPOL), dihexadecil fosfato (DHP), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), ácido octadecilfosfônico (OPA), Tris hidroximetil-amino-metano (Tris), p-nitrofenilfosfato (pNFF), vermelho de alizarina, soroalbumina bovina (BSA), dexametasona, cloramina T, p-dimetilaminobenzaldeído e colágeno foram comprados da Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA. Ácido ascórbico, soro fetal bovino (FBS), α -MEM, fungizona, gentamicina e tripsina são da Gibco-Invitrogen Technologies, USA. Acetato de sódio, ácido cítrico, ácido perclórico, n-propanol, hidróxido de sódio e ácido acético foram comprados da Fisher Scientific. Os reagentes utilizados para preparar o fluido corpóreo simulado (SBF) (cloreto de cálcio, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, fosfato de sódio dibásico, sulfato de sódio e tris-hidroximetilamino metano) são de grau analítico. Todas as soluções aquosas foram preparadas usando água ultra pura Milli-Q®.

4.2 Solução de SBF

SBF foi preparado como descrito por CÜNEYT TAS (2000). A concentração iônica final e o pH do SBF é similar àquela encontrada no plasma humano (KOKUBO, 1998).

4.3 Recobrimento por filmes LB

Na primeira fase de experimentos, as isotermas de OPA e DHP foram analisadas em uma cuba de Langmuir de 216 cm² (Insight-Brasil) a $25 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$, pelo espalhamento de 1.0 mmol/L de OPA ou DHP dissolvido em uma solução de clorofórmio/metanol (3:1, v/v – grau HPLC), em subfase aquosa de CaCl₂ 1 mmol/L. A interação entre os fosfolipídios e o Ca²⁺ na interface ar/líquido é comprovada pela redução da área molecular mínima na presença dos íons, comparada com a mesma na água pura (DE SOUZA et al., 2014).

As monocamadas de Langmuir foram transferidas para discos de Ti (ϕ 13 mm- REALUM-Brazil) previamente limpos utilizando acetona, álcool, e solução tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 7,5) contendo o surfactante Span 20 (4.0×10^{-5} mol/L) por 5 min, a 65°C em ultrassom, seguido por lavagem com água pura. Ao todo, 4 camadas dos filmes LB tipo Y (Figura 4) foram depositadas no Ti, mantendo a pressão superficial constante a 30 mN/m, e velocidade de imersão/emersão de 0,038 mm/s.

Tanto o OPA quanto o DHP são fosfolipídios aniônicos, formados por uma cabeça polar de grupo fosfato. O que os diferencia é o formato e o tamanho da cauda apolar: O OPA possui uma cauda constituída por 18 carbonos, já o DHP possui cauda formada por duas cadeias de 16 carbonos (Fig 6.a e 6.b, respectivamente),

Figura 6: a) Estrutura da molécula de OPA; b) Estrutura da molécula de DHP

O crescimento dos cristais de fosfato de cálcio foi realizado após a deposição dos filmes LB, pela exposição do Ti recoberto a ciclos alternados nas soluções de CaCl_2 e tampão fosfato 100 mmol/L ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7.5) (DE SOUZA et al., 2014). Então, o Ti recoberto por fosfato de cálcio foi finalmente exposto à solução de SBF para a formação de HAp (KOKUBO, 1998). Os filmes LB mineralizados depositados no Ti foram nomeados como Ti+OPA/HAp, e Ti+DHP/HAp. A caracterização dos filmes de DHP/HAp e OPA/HAp formados sobre os suportes de Ti foi previamente realizada por DE SOUZA et al. (2014) e RUIZ (2015).

Na segunda fase de experimentos, o recobrimento do Ti com os filmes LB foi realizado utilizando-se protocolos distintos:

I) Filmes LB de DHP e de DPPC foram transferidos para o Ti previamente limpo, em subfase de água contendo 50 μL da solução de PTH a 0,5 mg/mL, mantendo a π constante a 30 mN/m e velocidade de imersão/emersão de 0.038 mm/s. Estas coberturas foram chamadas de DHP/Ca+PTH e DPPC/Ca+PTH.

II) Após a produção da cobertura de Ti+DHP/HAp como descrito na primeira fase de experimentos da tese, foi gotejado 4 μL de PTH da solução a 25 $\mu\text{g/mL}$ à sua superfície, realizando posterior secagem em fluxo de nitrogênio. Esta cobertura foi nomeada de DHP/HAp+PTH G, sendo que a massa de PTH depositada em um disco de Ti recoberto foi padronizada para atingir a concentração final de 50 ng/mL quando em contato com 2 mL de meio de cultura.

4.4 Linhagem celular

As células mesenquimais estromais (MSCs) de ratos machos da linhagem Wistar (ratos jovens de 120g) foram isoladas a partir da medula óssea dos fêmures, cultivadas e diferenciadas em osteoblastos de acordo com o protocolo descrito por MANIATOPOULOS; SODEK; MELCHER (1988) com modificações padronizadas por DE FARIA et al. (2015).

4.5 Isolamento, cultura e diferenciação de MSCs de ratos

O procedimento de eutanásia dos animais e obtenção das células foi aprovado pelo Comitê de Ética local da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo sob o protocolo número 011/2014-1.

A obtenção das MSCs foi realizada através da extração dos fêmures de ratos machos

Wistar criados em biotério convencional (4 ratos por caixa, 12 horas de luz e 12 horas de escuridão). Os ratos foram eutanasiados por overdose de anestésico Xilasina (35 mg/Kg) e Ketamina Agener (230 mg/Kg). Os fêmures extraídos foram alocados para transporte em meio essencial mínimo com modificação α (α -MEM), fungisona e gentamicina, para a posterior extração de medula óssea (DE FARIA et al., 2016).

A medula foi retirada pela lavagem interna do fêmur com cerca de 15 mL de MTS, para a completa extração da medula óssea. Após este procedimento, o meio de cultura suplementado para a diferenciação osteoblástica com a medula óssea foram distribuídos em garrafas de cultura e cultivados em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. A extração da medula óssea foi realizada em capela de fluxo laminar para evitar a contaminação das culturas.

O meio de cultura utilizado possuía a composição de α -MEM (Meio Essencial Mínimo com modificação α) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 50 μ g/ml de gentamicina, 0,3 μ g/ml de fungisona, dexametasona 10⁻⁵M, 5,0 μ g/L de ácido ascórbico e 7 mM de β -glicerofosfato. Os meios foram trocados a cada 2 ou 3 dias. As culturas diferenciadas em osteoblastos foram acompanhadas em microscópio de fase invertida (Axiovert 25, Carl Zeiss, Germany) de 3 a 4 semanas. Após atingir a confluência, as células foram retiradas com tripsina 0,25% e EDTA 1 mM (ácido etilenodiamino tetra-acético) e transferidas para placas de 24 poços em concentração final de 2x10⁴ células/poço em todos os experimentos.

4.6 Contagem das células com Azul de Tripán

O Azul de Tripán em solução 0,1% (p/v) foi preparado, e a suspensão celular foi diluída na proporção 1:1 (v/v) com o corante. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico, possibilitando assim, estimar a concentração de células

viáveis em comparação às células lisadas.

4.7 Ensaio de viabilidade celular pela metodologia do MTT

O número total de células com a função mitocondrial intacta (vivas) foi determinado espectrofotometricamente através deste ensaio. O teste de viabilidade celular utiliza o corante MTT (brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium), que na presença da desidrogenase mitocondrial das células viáveis produzem cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em solução aquosa. Este processo ocorre pela atuação da enzima sobre o anel tetrazolium do MTT. Os cristais de cor púrpura foram dissolvidos em isopropanol acidificado, e o produto obtido foi monitorado em espectrofotômetro em 560 e 690 nm através de um sistema de análise de multiplaca. Um aumento ou diminuição no número de células viáveis resulta em uma mudança concomitante na formação dos cristais de formazan, indicando assim o grau de proliferação/morte (MOSMANN, 1983). Este método de monitoramento da viabilidade/citotoxicidade *in vitro* é bem estabelecido em placas de poços múltiplos.

Para investigar a viabilidade das culturas de osteoblastos crescidos no Ti limpo (controle - CT) e nas diferentes coberturas, uma suspensão de 2×10^4 células em 1 mL de meio de cultura foi adicionada a cada poço de teste de uma placa de 24 poços. As células foram utilizadas na sua fase logarítmica de crescimento e o número final de células não excedeu $1,0 \times 10^6$ células/mL. Os ensaios foram realizados em diferentes tempos de incubação, sempre em triplicata. Os resultados da viabilidade celular foram expressos como porcentagem das médias das triplicatas, comparados ao CT ao 7º dia (100%).

4.8 Dosagem de proteína total

As concentrações de proteína das culturas de osteoblastos foram determinadas pelo método relatado por HARTREE (1972) em presença de SDS 2% (p/v) ao 7º, 14º e 21º dia de

cultivo. A soroalbumina bovina foi empregada como padrão. As determinações foram feitas em triplicata e a estimativa da concentração proteica foi realizada a partir da curva padrão.

4.9 Determinação da concentração de colágeno

A concentração de colágeno das amostras foi medida de acordo com a metodologia de REDDY; ENWEMEKA (1996), expressa por μg de colágeno/mL. As análises foram realizadas ao 7º, 14º e 21º dia de cultura sobre as diferentes coberturas de Ti.

4.10 Determinação da atividade da ALP.

A atividade PNFFase da ALP das culturas de osteoblastos crescidos sobre o Ti+DHP/HAp e Ti+OPA/HAp foram determinadas descontinuamente, a 37°C, pela formação do íon p-nitrofenolato (PNF⁻) ($\epsilon = 17.600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, em pH 13) em tampão AMPOL (2-amino-2-metil-1-propanol) 50 mM, em pH 9,4 contendo MgCl_2 2 mM e p-nitrofenilfosfato (PNFF) 1 mM. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 410 nm. O protocolo foi realizado de acordo com CAMOLEZI et al. (2002).

4.11 Preparação das frações de membrana ricas em ALP

As frações de membrana ricas em ALP foram obtidas em procedimento descrito por Simão et al. (2010). As células foram lavadas com tampão Tris-HCl 50 mM + MgCl_2 a 2 mM, removidas das placas de cultura e ressuspensas em tampão Tris-HCl 50 mM + MgSO_4 10 mM e NaCl 0,8 M (tampão de choque osmótico). Esta suspensão foi homogeneizada, em seguida ultracentrifugada A 100000xg a 4°C por 1 hora. O sobrenadante foi descartado, o pellet contendo a fração de membrana após ser ressuspensa em tampão estoque, foi incubada com fosfolipase C específica para a âncora de fosfatidilinositol para o isolamento da fosfatase alcalina. A mistura foi ultracentrifugada a 100.000 g, por 1 hora, a 4°C, e o sobrenadante foi

separado do pellet em alíquotas (CIANCAGLINI et al., 2006).

4.12 Avaliação da formação de matriz mineralizada

A formação de matriz mineralizada foi avaliada ao 14º e 21º dias de cultura, quando já se formaram os nódulos de deposição de cristais de HAp na matriz extracelular. Para tal finalidade, foram utilizadas duas técnicas distintas:

A) Os nódulos fixados com solução de formol a 10% (v/v) por 24 horas foram desidratados em série crescente de álcoois: álcool 30% - álcool 50% - álcool 70% - álcool absoluto (1 hora cada). Posteriormente os nódulos foram corados com vermelho de alizarina, que tingem em vermelho os nódulos de mineralização ricos em cálcio. Logo após, o conteúdo dos poços foi solubilizado com ácido acético 10% e neutralizado com hidróxido de amônia 10%. A leitura da absorbância foi realizada a 405nm, como em procedimento descrito por GREGORY et al. (2004).

B) A razão molar de Ca/P dos nódulos foi avaliada por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX) (IXRF system 500 Digital Processing spectrometer - DQ/FFCLRP-USP). As imagens obtidas foram processadas em analisador de imagens (Image Tool), onde foram quantificados estes átomos na matriz mineralizada.

4.13 Morfologia, adesão e proliferação dos osteoblastos

A fim de investigar a morfologia dos osteoblastos crescidos sobre as diferentes superfícies, estes foram avaliados por:

a) Microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o microscópio Zeiss-EVO50 da FMRP/USP. Para tal, as células foram previamente tratadas com glutaraldeído, ósmio e desidratadas em gradiente de CO₂ (ROUAHI et al., 2006) e então recobertas com ouro. As análises foram realizadas utilizando amostras coletadas ao 14º e 21º dia de cultura.

b) A microscopia confocal também foi utilizada para investigar a morfologia e o crescimento celular, utilizando o microscópio Leica TCS SP5 da FMRP/USP. Nesta técnica, os osteoblastos foram fixados com formol a 5% e tingidos com laranja de acridina (0,005mg/mL), um fluoróforo que proporciona um contraste de imagem pela ligação aos ácidos nucleicos dos osteoblastos (RNA em vermelho, e DNA em verde). Para a visualização do DNA, as amostras foram excitadas utilizando a linha de 488 nm de um laser de argônio, e a emissão foi coletada entre 499 e 541 nm. A visualização do RNA foi feita por excitação, utilizando a linha de 458 nm de um laser de argônio. E a emissão foi coletada entre 642 e 682 nm (SHI et al., 2009). As amostras foram analisadas ao 14º e 21º dia de cultura. Na segunda fase de experimentos, este ensaio foi realizado da mesma maneira descrita previamente, com os Ti recobertos com DHP/HAp+PTH.

CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PRODUZIDOS NA SEGUNDA FASE DE EXPERIMENTOS DA TESE

4.14 Potencial Zeta do PTH

A superfície de muitos materiais particulados pode assumir uma carga elétrica quando há o contato com um líquido. O aparecimento de carga em partículas pode ser devido à dissociação de alguns grupos iônicos na sua superfície, ou também pela adsorção de íons presentes na solução. A distribuição de íons ao redor de uma partícula é afetada pela sua carga líquida, aumentando a concentração dos contraíons junto à sua superfície. Assim, há a formação de uma camada dielétrica na interface do líquido com a partícula, onde pode-se encontrar uma região interna possuindo íons fortemente ligados à superfície, denominada camada de Stern (STERN, 1924), uma região externa a esta, chamada de camada difusa (CHAPMAN, 1913; GOUY, 1910), onde o movimento térmico e forças eletrostáticas

determinam a distribuição dos íons. O potencial elétrico na superfície de cisalhamento é conhecido como potencial-zeta (ζ), cujo valor pode ser determinado pela medida de um dos fenômenos eletrocinéticos relacionados ao movimento relativo entre a superfície, ao movimento por um campo elétrico, à fase líquida e ao movimento mecânico (ADAMSON; GAST, 1997).

Figura 7: Representação esquemática da estrutura da dupla camada elétrica: Camada de Stern e Camada difusa.

4.15 Microbalança de cristal de quartzo (QCM)

As massas dos fosfolipídios DHP e DPPC e do PTH depositados a partir dos filmes LB foram determinadas por uma QCM, técnica baseada nas variações da vibração de um

cristal de quartzo piezoelétrico recoberto por ouro (Figura 8), devido às variações da massa que foi depositada sobre a sua superfície. A frequência possui relação com a massa pela equação de SAUERBREY (1959), onde ΔF é a variação de frequência medida, F_0 a frequência de vibração do cristal aferida antes do início da deposição, A representa a área do cristal e Δm a variação de massa:

$$\Delta F = \frac{2F_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\mu_c \rho_c}} \quad \text{Equação 3}$$

Medidas de frequência foram feitas antes e após a deposição de duas camadas dos fosfolípidos DHP e DPPC com e sem PTH sobre o cristal (International Crystal Manufacturing, 10MHz). A frequência de oscilação foi monitorada utilizando um frequencímetro Lutron FC700TCXO.

Figura 8: Cristal piezoelétrico de quartzo

4.16 Espectroscopia de Infravermelho

As técnicas de análises na região do infravermelho baseiam-se na interação da matéria com a radiação eletromagnética, permitindo correlacionar as informações aos diferentes tipos

de ligações químicas das estruturas (LIU; WEBSTER, 2007). Não há destruição do material pois esta radiação possui baixa energia.

Nos espectrofotômetros que utilizam esta metodologia, a radiação infravermelha emitida passa por um interferômetro logo antes de incidir na amostra. Um gráfico de intensidade em função do deslocamento de um espelho móvel será gerado assim que a radiação que não é absorvida pela amostra chega a um detector. Utilizando a transformada de Fourier, este sinal será transformado em um espectro que descreve o número de fótons detectados em função da frequência de radiação. As análises de FTIR podem também ser feitas por reflexão total atenuada (ATR) (KAZARIAN; CHAN, 2013). Este modo de análise permite a reflexão de um feixe que incide em determinado ângulo crítico passando de um cristal para a amostra. Uma parcela da radiação incidente consegue penetrar na amostra de forma superficial. Quando ocorre a absorção da radiação pela amostra, o feixe sofre atenuação e assim pode-se fazer a identificação das bandas de absorção da amostra e das ligações químicas presentes em seus compostos.

4.17 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas pelo programa Graph Pad Prism 5 (versão 5 Prism, Graph Pad, USA). Para tanto, foi utilizada a análise de variância entre os grupos (ANOVA) “Two-way”, e o teste complementar de Bonferroni, considerando-se um nível de significância $p < 0.05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 1ª FASE DE EXPERIMENTOS

A cobertura do Ti por HAp é a principal modificação com significância biológica para aplicações em substituição óssea (BRIE et al., 2014; DE SOUZA et al., 2014; HABIBOVIC; BARRERE, 2002) devido à sua similaridade com a fase inorgânica deste tecido, sendo um fator que leva ao aumento da osteointegração. No entanto, há vários fatores limitantes para a maioria dos processos de desenvolvimento destes biomateriais, como baixa homogeneidade das coberturas e falta de conhecimento das concentrações ideais de cálcio para estimular a biomineralização (BARRÈRE et al., 2003; RØKKUM; REIGSTAD; JOHANSSON, 2002). O controle de alguns parâmetros como a rugosidade, a molhabilidade, a energia superficial, e a composição química são essenciais para tecer a interação entre os biomateriais e o tecido alvo (SCHMIDT; HEALY, 2009).

As coberturas de Ti+DHP/HAp e Ti+OPA/HAp testadas na primeira fase do presente estudo foram desenvolvidas por uma técnica biomimética, com alto controle dos parâmetros físico-químicos e da superfície nanoestruturada. A concentração de HAp é a principal diferença entre as duas coberturas, a qual é 1,88 vezes maior na cobertura de Ti+OPA/HAp do que na cobertura de Ti+DHP/HAp, segundo experimentos de biomineralização que serão mostrados adiante.

Ambas coberturas exibem alta energia livre superficial e molhabilidade, relacionadas com a composição, carga e textura, como está mostrado na Tabela 3, correlacionando os estudos de DE SOUZA et al. (2014) e RUIZ (2015). Estas características, juntamente com a similaridade à fase inorgânica dos ossos, levou ao investimento desta pesquisa para atestar o potencial uso destas superfícies como biomateriais osteogênicos.

Tabela 3. Parâmetros comparativos das coberturas de Ti+DHP/HAp e Ti+OPA/HAp descritos por SOUZA *et al.* (2014) e RUIZ (2015), respectivamente.

Parâmetros	Ti	Ti+DHP/HAp	Ti+OPA/HAp
Energia livre superficial (mJ/m ²)	51,7 (± 2,1)	60,9 (± 0,1)	71,3 (± 1,0)
Componente polar (mJ/m ²)	19,4 (± 2,8)	31,1 (± 0,2)	41,7 (± 1,9)
θ (°)	53,2 (± 1,0)	< 3 (± 1)	4,1 (± 0,4)
Rugosidade (nm)	32 (± 3)	126 (± 10)	78,8 (± 7)
Área superficial (µm ²)	28 (± 1)	43 (± 3)	33 (± 2)

Estudos mostram que um aumento da rugosidade superficial dos biomateriais está positivamente relacionado a um aumento da adesão e diferenciação de células, da atividade da ALP, e uma melhor fixação óssea do que implantes lisos *in vivo* (AHMAD et al., 1999; BUSER et al., 1991; FENG et al., 2003). Interações entre os biomateriais e as células estão relacionados à energia livre superficial, o que pode vir a influenciar na adesão e proliferação dos osteoblastos. O comportamento das culturas são especialmente influenciados pela componente polar da energia superficial (FENG et al., 2003; SCHAKENRAAD et al., 1988). Componentes polares muito baixas poderiam inibir a adesão osteoblástica (FENG et al., 2003; REDEY et al., 2000).

5.1.1 Isotermas de OPA e DHP

As isotermas de fosfolipídios em subfase de água contendo CaCl₂ (1 mmol/L) sofreram diminuição na área mínima ocupada por molécula quando comparadas às isotermas

em subfase de água pura, de 23 Å² para 19 Å² para moléculas de OPA, e de 50 Å² para 42 Å² para moléculas de DHP (Fig.9). Os íons Ca²⁺ presentes na subfase interagem preferencialmente com o grupo fosfato carregado negativamente presente em ambos fosfolipídios utilizados, diminuindo a repulsão das cargas negativas e favorecendo o empacotamento dos lipídios em uma menor área ocupada por molécula (DE SOUZA et al., 2014).

A área mínima ocupada por cada molécula de OPA é menor do que a área mínima ocupada pelo DHP devido à estrutura dos fosfolipídios, principalmente de suas cadeias carbônicas apolares, pois o DHP possui 2 cadeias carbônicas, ocupando uma maior área se comparado à cadeia carbônica única da molécula de OPA (Fig.6).

Figura 9. Isotermas de π vs área por molécula obtidas sobre água pura e em subfase de CaCl₂ para monocamadas de: a) DHP; b) OPA.

5.1.2 Monocamadas de Langmuir e coberturas de DHP/HAP e OPA/HAp

A Figura 10 mostra uma representação esquemática das coberturas de OPA/HAp e DHP/HAp sobre o Ti. Onde temos a estrutura química do OPA e o Ti recoberto pelo filme de

OPA/HAp (Fig. 10a), a estrutura química do DHP e o Ti recoberto pelo filme de DHP/HAp (Fig. 10b), e a área mínima ocupada por molécula de OPA e DHP na presença de Ca^{2+} (Fig. 10c). A diferença na área mínima ocupada por molécula de OPA e DHP pode ser correlacionada com a diferença na distância entre os grupos fosfato dos lipídios. Quando transferidos para suportes sólidos (Filmes LB), a diferença de distância entre os grupos fosfato leva a diferentes concentrações interfaciais de Ca^{2+} , na ordem de 1,88 vezes mais Ca^{2+} para suportes cobertos com OPA, comparado com o DHP. A aquisição deste dado será mostrado em detalhes mais adiante, na formação da matriz mineralizada.

Figura 10. Representação esquemática das coberturas de OPA/HAp e DHP/HAp sobre o Ti. a) Estrutura química do OPA e o Ti recoberto pelo filme de OPA/HAp; b) Estrutura química do DHP e o Ti recoberto pelo filme de DHP/HAp; c) Área mínima ocupada por molécula de OPA e DHP na presença de Ca^{2+} .

5.1.3 Viabilidade celular

Os ensaios da viabilidade celular dos osteoblastos foram realizados para investigar o comportamento destas células em contato com as diferentes coberturas de HAp em três diferentes estágios de crescimento: inicial, intermediário e estacionário (ZANCANELA et al., 2016). A Figura 11 mostra o gráfico da viabilidade celular dos osteoblastos crescidos sobre as diferentes coberturas de Ti e seus controles, ao 7º, 14º e 21º dia de cultura. Os osteoblastos crescidos sobre a cobertura de Ti+OPA/HAp tiveram uma diminuição na viabilidade ao 7º dia, em contraste com um aumento da viabilidade ao 14º dia quando comparado ao Ti. Ao 21º dia de cultivo não houveram diferenças significativas comparadas ao Ti. Já a viabilidade celular dos osteoblastos crescidos sobre as coberturas de Ti+DHP/HAp aumentaram ao 7º, 14º e 21º dia de cultura quando comparados ao Ti limpo.

As amostras de Ti recoberto somente com os filmes LB, sem a posterior etapa de formação de mineral (Ti+OPA/Ca e Ti+DHP/Ca) diminuíram a viabilidade dos osteoblastos em todos os dias testados tanto em comparação ao Ti limpo, quanto em comparação às coberturas de Ti+OPA/HAp e Ti+DHP/HAp.

Todas as amostras de culturas celulares tiveram o ápice de crescimento celular ao 14º dia. Isto ocorre devido ao fato de ser neste momento que ocorre o início da biomineralização, e a partir deste ponto algumas células já começam a ser perfuradas pelos cristais de HAp, liberando o seu conteúdo citoplasmático para a formação da matriz mineralizada.

A literatura relata que a HAp presente em recobrimentos implantados sofre solubilização da sua primeira camada superficial. Causando a liberação de íons Ca^{2+} até atingir um equilíbrio entre a superfície de HAp e os fluidos locais (BERTAZZO et al., 2010; DOROZHKIN, 2007, 2009). Nayab e seus colaboradores (NAYAB; JONES; OLSEN, 2005) relataram que superfícies de Ti com altas concentrações de Ca^{2+} (10^{17} ions/cm²) diminuem significativamente a adesão de células MG-63 em um momento inicial após o plaqueamento,

mas 24h após a incubação há um aumento do número de células aderidas, aumento do tamanho das células e da granulosidade quando comparados ao controle. Superfícies de Ti com médias e baixas concentrações de Ca^{2+} (10^{16} e 10^{15} ions/cm², respectivamente) não demonstraram este comportamento nas culturas de células. No entanto, este estudo não relatou as respostas celulares tardias (após 7, 14 e 21 dias de cultivo) como realizados neste trabalho.

A diminuição inicial da viabilidade observada para os osteoblastos crescidos sobre a cobertura de Ti+OPA/HAp ao 7º dia, e subsequente explosão no crescimento ao 14º dia (Fig.11) podem ser atribuídas principalmente às altas concentrações de Ca^{2+} nesta cobertura comparada ao Ti e à cobertura de Ti+DHP/Ca (Fig. 10). Já o aumento da proliferação dos osteoblastos sobre a cobertura de Ti+DHP/HAp pode ser atribuído à alta rugosidade, molhabilidade e composição mineral mais similar ao tecido ósseo, com uma concentração de Ca^{2+} menor do que a cobertura de Ti+OPA/HAp (Fig. 10).

As amostras de Ti recobertas por filmes LB sem a subsequente deposição de mineral (Ti+OPA/Ca e Ti+DHP/Ca) diminuíram a viabilidade dos osteoblastos em todos os dias testados, devido a alta hidrofobicidade das superfícies na ausência de HAp (FENG et al., 2004).

Figura 11. Viabilidade celular de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como porcentagem da média de três experimentos realizados em triplicata, comparado ao controle (100%). * $p < 0,05$ vs controle de Ti, nos respectivos dias de crescimento.

Ti: Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti+OPA/Ca:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de OPA contendo Ca^{2+} na subfase aquosa da cuba de Langmuir. **Ti+OPA/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de OPA e HAp. **Ti+DHP/Ca:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP contendo Ca^{2+} na subfase aquosa da cuba de Langmuir. **Ti+DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp.

5.1.4 Dosagem de proteína total

A Figura 12 mostra a variação do conteúdo total de proteínas produzidas pelos osteoblastos crescidos sobre as diferentes coberturas de Ti e seus controles em diferentes fases do crescimento celular (7, 14 e 21 dias de cultivo). Nesta figura podemos observar um aumento significativo do conteúdo proteico total pelos osteoblastos crescidos sobre a cobertura de Ti+DHP/HAp ao 7º, 14º e ao 21º dia, quando comparados ao CT, Ti limpo e à cobertura de Ti+OPA/HAp. Não houveram modificações significativas da produção de proteína pelos osteoblastos crescidos sobre a cobertura de Ti+OPA/HAp quando comparados ao controle de plástico e de Ti. A Fig.12 também evidencia o aumento natural na concentração de proteínas entre o 7º, 14º e 21º dia dentro de cada grupo.

A concentração proteica em uma cultura de osteoblastos está intimamente ligada ao número de células viáveis e à sua capacidade de secretar colágeno, ALP, proteínas de membrana, entre outras (SIMÃO et al., 2007). O aumento da dosagem total de proteínas dos osteoblastos cultivados sobre Ti+DHP/HAp mostrado na Figura 12 está em concordância com o aumento da viabilidade celular ao 7º e ao 14º dia de cultivo (Figura 11). No entanto, esta correlação não foi encontrada para os osteoblastos crescidos sobre o Ti+OPA/HAp, pois seu conteúdo proteico não aumentou ao 14º dia apesar de um significativo aumento da viabilidade. Este dado pode ser devido à diminuição da concentração de colágeno ao 14º dia, uma das proteínas mais abundantes produzida pelos osteoblastos (Figura 13). Os resultados encontrados para a concentração proteica de osteoblastos crescidos sobre a cobertura de Ti+DHP/HAp concordam com aqueles publicados por Feng e seus colaboradores (FENG et al., 2004), onde superfícies recobertas com cálcio e fosfato aumentaram o número e a adsorção de proteínas da matriz extracelular. Os dados encontrados concordam também com Rouahi e seus colaboradores (ROUahi et al., 2006), que mostraram um aumento das proteínas totais de células da linhagem Saos-2 (similares a osteoblastos humanos) durante a

adesão em materiais ortopédicos recobertos com HAp quando comparados ao controle, onde este aumento foi relacionado à diferenças na topografia dos materiais. No entanto, estes testes avaliaram o conteúdo proteico total em tempos de até 96 horas, enquanto as dosagens desta pesquisa foram realizadas em até 21 dias de cultivo. LEE et al. (2011) também demonstraram que células MC3T3-E1 crescidas sobre o Ti recoberto por HAp pela metodologia de colisões em alta velocidade e baixas temperaturas tiveram uma elevação do conteúdo proteico total quando comparados ao Ti sem cobertura.

Figura 12. Dosagem de proteína total de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como a média de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle de Ti, nos respectivos tempos de cultivo.

CT: Osteoblastos crescidos sobre a placa de cultura. **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti+OPA/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de OPA e HAp. **Ti+DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp.

5.1.5 Determinação da concentração de colágeno

O colágeno tipo I é a proteína mais abundante na matriz óssea, constituindo cerca de 90% da fase orgânica do tecido ósseo (BOSKEY, 2013; YOUNG, 2003). Suas fibras são polímeros de moléculas de tropocolágeno, organizadas em uma tripla hélice (COZZOLINO et al., 2016). A produção de colágeno em culturas primárias de osteoblastos é elevada com o passar do tempo, atingindo um platô com a completa mineralização das culturas, por volta do 21º dia de cultivo (ZANCANELA et al., 2016). A sua elevação também segue o aumento do conteúdo proteico total, pois esta é uma proteína também medida de forma inespecífica pela metodologia de HARTREE (1978).

A Figura 13 mostra a diferença da concentração de colágeno das culturas de osteoblastos crescidos sobre as diferentes coberturas e seus controles, tanto ao 7º, ao 14º e ao 21º dia de cultivo. Ao 7º dia de cultivo não houve diferença estatística entre a produção de colágeno das coberturas testadas e o CT e Ti. Ao 14º dia de cultivo, tanto a cobertura de Ti+OPA/HAp e Ti+DHP/HAp diminuíram a concentração de colágeno produzida pelos osteoblastos quando comparado ao CT e ao Ti. Ao 21º dia de cultura a concentração de colágeno produzidas pelos osteoblastos crescidos sobre a cobertura de Ti+DHP/HAp aumentou significativamente quando comparado ao Ti e ao CT. Já cobertura de Ti+OPA/HAp diminuiu a produção de colágeno pelos osteoblastos em comparação ao controle, Ti limpo e cobertura de Ti+DHP/HAp. Este resultado pode ser devido a uma perda do fenótipo dos osteoblastos, evidenciado pela falta de biomineralização destas culturas.

Os resultados encontrados neste trabalho concordam parcialmente com os estudos de RAMIRES et al. (2001), que mostrou um aumento significativo na produção de colágeno por células da linhagem MG63 (similares a osteoblastos) crescidas em coberturas de Ti/HAp preparadas em baixas e médias concentrações de HAp (na razão de 1:1 e 2:1), enquanto a

cobertura de Ti/HAp de razão 1:2 (alta concentração de HAp) foi similar ao titânio sem recobrimento. SIMÃO et al. (2007) avaliaram a concentração de proteínas totais, colágeno e ALP de células derivadas de osso alveolar e demonstrou a expressão destes marcadores do fenótipo osteoblástico. No entanto, neste estudo foi encontrado que os maiores valores de colágeno eram ao redor do 14º dia de cultura.

BRIE et al. (2014) mostraram um aumento da concentração de colágeno em culturas de osteoblastos humanos isolados de osso patelar, quando crescidos sobre o Ti poroso modificado por infiltração sol-gel com HAp e sobre o Ti poroso modificado por infiltração sol-gel de silicatitanato quando comparados ao controle de Ti poroso ao 28º dia de crescimento. No entanto, houve uma diminuição da concentração de colágeno ao 35º dia de cultura. BIGI et al. (2007) observaram um aumento da concentração de colágeno nas culturas células de medula óssea de fêmur humano diferenciadas em osteoblastos, quando crescidos sobre o Ti13Nb13Zr nanoestruturado e Ti6Al4V recobertos com HAp, em comparação aos mesmos sem a cobertura. Nossos estudos não seguiram com o cultivo até o 35º dia devido ao completo recobrimento da placa de 24 poços pelas células por volta do 21º dia.

Figura 13. Dosagem da concentração de colágeno de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como a média de três experimentos realizados em triplicata.

* $p < 0,05$ vs controle de Ti, nos respectivos dias de cultivo.

CT: Osteoblastos crescidos sobre a placa de cultura. **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti+OPA/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de OPA e HAp. **Ti+DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp.

5.1.6 Atividade da ALP

O comportamento normal da atividade da ALP observado em culturas primárias de osteoblastos é um aumento da sua atividade até por volta do 14º dia de crescimento, onde ocorre um pico que coincide com o início do processo de biomineralização (Fig.14). A partir deste momento, a atividade da ALP sofre um decréscimo consecutivo, relacionado à diminuição do número de osteoblastos vivos.

A Figura 14 mostra a atividade da ALP das culturas de osteoblastos crescidos sobre as coberturas de Ti+DHP/HAp, Ti+OPA/HAp, controle de Ti e sobre a placa de cultura ao 7º, 14º e 21º dias. Ao 7º dia de cultivo não houve diferença estatística entre a atividade da ALP das coberturas testadas e do CT e ao Ti. Ao 14º dia de cultura houve um aumento da atividade da ALP dos osteoblastos crescidos sobre as coberturas de Ti+DHP/HAp em comparação ao CT, Ti limpo e Ti+OPA/HAp. Sendo que esta última cobertura citada não apresentou diferença na atividade da ALP comparada ao CT e ao Ti. Ao 21º dia de cultivo houve uma diminuição da atividade da ALP dos osteoblastos crescidos sobre a cobertura de Ti+OPA/HAp quando comparado à cobertura de Ti+DHP/HAp, ao CT e Ti. Já a cobertura de Ti+DHP/HAp não mostrou diferença na atividade da ALP ao 21º dia quando comparada ao CT e ao Ti.

O resultados apresentados na Figura 14 estão de acordo com os dados de Hoylaerts et al. (HOYLAERTS et al., 2015), Leone et al. (LEONE; CIANCAGLINI; PIZAURO, 1997), e Pizauro et al. (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1993), que correlacionaram a inativação da ALP à altas as concentrações de Ca^{2+} . A perda da atividade da ALP pode ser devido ao deslocamento dos íons Mg^{2+} e Zn^{2+} de seus sítios de ligação cataliticamente importantes (HOYLAERTS et al., 2015; LEONE; CIANCAGLINI; PIZAURO, 1997).

Outra importante função do Ca^{2+} é a sinalização celular. Em muitos tipos de células ele age como mensageiro que inicia respostas intracelulares, ou como segundo mensageiro

quando ligado à proteínas específicas em processos como a mitose, transmissão neuronal, contração e relaxação dos músculos, transcrição gênica e morte celular entre outras (NELSON; COX, 2014). No tecido ósseo, o Ca^{2+} pode controlar a proliferação osteoblástica e a diferenciação por se ligar à calmodulina e calcineurina, regulando a expressão de genes importantes (ZAYZAFON, 2006). A diferenciação e a reabsorção óssea pelos osteoclastos também são reguladas pelas oscilações nas concentrações de Ca^{2+} por um sistema Ca/Calcineurina (HWANG; PUTNEY, 2011).

O fato da cobertura de Ti+OPA/HAp possuir 1,88 vezes mais Ca^{2+} do que a cobertura de Ti+DHP/HAp influenciou diretamente na atividade da ALP, pois apesar do Ca^{2+} estar na forma sólida de HAp e seu produto de solubilidade ser baixo, o constante contato com o meio de cultura *in vitro* (ou fluidos corporais como sangue, soro e saliva *in vivo*) faz com que a HAp sofra uma solubilização para atingir seu equilíbrio, e ocorra a liberação de íons Ca^{2+} (BERTAZZO et al., 2010).

Os resultados também estão de acordo com RAMIRES et al. (2001), que mostraram um aumento da atividade da ALP de células da linhagem MG-63 crescidas sobre o Ti recoberto com HAp em várias proporções, quando comparados ao Ti não recoberto ou poliestireno. Todas as amostras recobertas exibiram a mesma estimulação da expressão de marcadores bioquímicos específicos do processo de biomineralização, como a ALP e osteocalcina. Este aumento da atividade da ALP pelos Ti recobertos foi explicada pelas características da composição química, aliada à técnica de deposição por ciclos de imersão em suspensão de HAp que afetou as propriedades físicas do Ti. FENG et al. (2004) mostraram um aumento da atividade da ALP das culturas primárias de osteoblastos crescidos sobre o Ti modificado com apatitas, quando comparados ao Ti puro e à coberturas contendo somente cálcio ou somente íons fosfato. Sendo que as coberturas que continham somente cálcio obtiveram valores da atividade superior ao das coberturas contendo somente fosfato. Estudos realizados por LIU et

al., (2011) também mostraram uma elevação da atividade da fosfatase alcalina de células MG-63 (similares a osteoblastos) crescidas sobre o Ti liso e o Ti jateado com areia (para modificação da rugosidade) recobertos com carbonato de cálcio, quando comparados ao Ti sem recobrimento.

E com isso, pode-se concluir que os diferentes fosfolipídios utilizados para a fabricação das coberturas, e consequentemente, a concentração de HAp produzida em sua superfície podem influenciar na atividade das enzimas regulatórias da mineralização óssea.

Figura 14. Atividade da fosfatase alcalina dos osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como a média de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle de Ti, nos respectivos períodos de crescimento.

CT: Osteoblastos crescidos sobre a placa de cultura. **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti+OPA/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de OPA e HAp. **Ti+DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp.

5.1.7 Avaliação da formação de matriz mineralizada e EDX

A formação da matriz mineralizada corresponde à síntese natural de HAp pelos osteoblastos, iniciando por volta do 14º dia de cultura (ZANCANELA et al., 2016). A Figura 15 mostra que a cobertura de Ti+OPA/HAp diminuiu a mineralização da matriz óssea tanto ao 14º quanto ao 21º dia de cultivo em comparação ao Ti limpo. Já a cobertura de Ti+DHP/HAp foi capaz de estimular o aumento da mineralização da matriz óssea tanto ao 14º quanto ao 21º dia de cultivo, comparado ao Ti e ao Ti+OPA/HAp.

Uma vez que as coberturas já contém Ca^{2+} em sua composição, a absorbância das coberturas de Ti+OPA/HAp e Ti+DHP/HAp sem o crescimento de osteoblastos (como controles), também foi testado (Fig.15 inserção). As leituras das absorbâncias das concentrações de Ca^{2+} previamente presente nas coberturas mostraram que a cobertura de OPA/HAp possui níveis de Ca^{2+} 1,88 vezes maior que a cobertura de DHP/HAp.

A formação da matriz mineralizada é considerado um processo natural que ocorre em osteoblastos, condroblastos e odontoblastos (ZANCANELA et al., 2016). Os cristais de HAp formados dentro das MVs são depositados simultaneamente com as fibras de colágeno, formando a rígida matriz dos ossos mineralizados (MILLÁN, 2013). Por volta do 14º dia de cultivo dos osteoblastos, quando ocorre o pico da atividade da ALP e aumento da liberação de fosfato orgânico, o processo de biomineralização é iniciado. O auge da formação de HAp ocorre por volta do 21º dia de cultura (SIMÃO et al., 2010).

O significativo aumento da formação da matriz mineralizada sobre a cobertura de Ti+DHP/HAp pode ser atribuído às suas características físico-químicas como elevada rugosidade e molhabilidade, que elevam a proliferação osteoblástica, aumentam a concentração proteica total, colágeno e ALP, resultando em um aumento significativo na formação da matriz mineralizada.

Contudo, apesar das características físico-químicas semelhantes, a cobertura de Ti+OPA/HAp diminuiu a formação da matriz mineralizada pelos osteoblastos, o que pode estar relacionado à diminuição da atividade da ALP, que diretamente diminui a liberação de fosfato inorgânico e consequentemente, a formação de HAp.

Nossos resultados estão de acordo com YANG et al. (2014), que mostraram um aumento na mineralização de culturas de osteoblastos crescidos sobre coberturas de Ti/LbL/HAp, quando comparados ao controle de Ti tanto ao 7º quando ao 14º dia de cultura. Ozawa e Kasugai (OZAWA; KASUGAI, 1996) mostraram uma elevação na formação e no número dos nódulos mineralizados de culturas de osteoblastos diferenciados de células de medula óssea crescidos sobre materiais de implante de HAp, quando comparados ao Ti.

Os nódulos minerais crescidos sobre as duas coberturas também foram analisados pela técnica do EDX ao 14º e ao 21º dia de cultura, a fim de seguir o processo de mineralização osteoblástica. A Fig.16 evidencia os picos de cálcio e fósforo vistos pela técnica; e mostra a razão molar Ca/P das amostras. Ambas coberturas testadas apresentaram razão molar $1,67 \pm 0,17$, similar à razão molar de Ca/P=1,66 presente na HAp ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

No sistema biológico, as apatitas exercem um importante papel, oferecendo sustentabilidade e proteção à órgãos vitais. Diversos tipos de apatitas com diferentes razões molares de Ca/P podem ser encontradas na natureza, como por exemplo a HAp deficiente em cálcio (Ca/P 1,5 – 1,6) e o fosfato de cálcio amorfo (Ca/P 1,2 – 2,2), assim como outros citados na Tabela 2, ou podem ter origem sintética (MARKOVIC; FOWLER; TUNG, 2004). Nos mamíferos, a HAp e a carbonato-HAp são os constituíndes da maior parte da composição do tecido ósseo, do esmalte e dentina, no entanto as outras fases também são encontradas em quantidades menores (KAWACHI et al., 2000).

Figura 15. Formação da matriz mineralizada de cultura de osteoblastos ao 14º e 21º dias. O resultado foi expresso como a média da absorbância de três experimentos realizados em triplicata. Inserção: Absorbância do Ti+OPA/HAp e Ti+DHP/HAp sem o crescimento de osteoblastos. * $p < 0,05$ vs controle de Ti, nos respectivos dias de crescimento.

Ti: Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti+OPA/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de OPA e HAp. **Ti+DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp.

Figura 16. Análise por EDX das superfícies mineralizadas ao 14° e 21° dias de cultura de osteoblastos. Inserção: Tabela contendo os valores brutos das análises e a razão molar dos nódulos.

Ti: Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti+OPA/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de OPA e HAp. **Ti+DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp.

5.1.8 Microscopia eletrônica de varredura

A Fig.17 mostra as imagens de MEV das amostras obtidas após 14 e 21 dias de cultura. Comparando as imagens obtidas ao 14º dia de cultivo (Fig.17a-f), estas revelaram diferenças na morfologia dos osteoblastos no Ti, Ti+OPA/HAp, e Ti+DHP/HAp. A Fig. 17a e 17d mostram que os osteoblastos crescidos sobre o Ti limpo (setas vermelhas) são menos espalhados que aqueles cultivados nas coberturas de Ti+OPA/HAp e Ti+DHP/HAp. Além disso, pode-se notar que as células cultivadas sobre o Ti estão em um estágio mais avançado de maturação comparado aos crescidos sobre as coberturas, o que foi revelado pela maior quantidade de fibras de colágeno (setas azuis) e cristais de HAp (setas amarelas). Os osteoblastos aderiram e se espalharam favoravelmente nas coberturas de Ti+DHP/HAp e Ti+OPA/HAp (Fig.17b, c, e, f) como revelado pelas longas extensões citoplasmáticas (setas vermelhas). No entanto, estão em um estágio de maturação prévio, como indicado pelo início da formação de fibras de colágeno nas bordas celulares (setas azuis).

As imagens de MEV obtidas ao 21º dia de cultura (Fig. 17g-l) mostraram a mineralização total dos osteoblastos crescidos sobre o Ti (Fig. 17g, 17j), evidenciado pela presença dos cristais de HAp (setas amarelas) e colágeno (setas azuis). O citoplasma celular foi completamente extravasado, e não há a presença de células vivas. No entanto, a Fig.17h e 17k mostraram que a cobertura de Ti+DHP/HAp produziu uma formação intensa de matriz mineralizada (setas amarelas) e de colágeno (setas azuis), e ainda mostrou manter osteoblastos intactos (setas vermelhas). No entanto, o Ti+OPA/HAp (Fig. 17i e 17l) mostrou estimular o crescimento dos osteoblastos, mas com pouca produção de matriz mineralizada e colágeno.

As imagens de MEV (Fig.17) mostraram diferenças nas formas dos osteoblastos cultivados sobre o Ti limpo e no recoberto. O aumento da molhabilidade e energia superficial de ambas coberturas testadas favorecem o espalhamento e a quantidade de osteoblastos, pois estudos mostraram que componentes polares muito baixas poderiam inibir a adesão

osteoblástica (FENG et al., 2003; REDEY et al., 2000). A energia livre superficial está relacionada a interações entre biomateriais e as células, podendo influenciar na adesão e proliferação dos osteoblastos. A cobertura de Ti+DHP/HAp mostrou ser a mais eficiente em estimular a biomineralização, com elevada produção de fibras colágenas e nódulos de HAp quando comparadas ao Ti e à cobertura de Ti+OPA/HAp, além de manter osteoblastos viáveis após 21 dias de cultivo. A cobertura de Ti+OPA/HAp diminuiu a formação de cristais de HAp e fibras de colágeno tanto ao 14º quanto ao 21º dia de cultivo. Estas imagens confirmaram que a mudança das concentrações de Ca^{2+} nas coberturas de Ti afetam diretamente os parâmetros da biomineralização *in vitro*.

RAMIRES et al. (2001), cultivaram células da linhagem MG63 (similares a osteoblastos humanos) por 10 dias sobre o Ti simples, e sobre coberturas de TiO_2 com diferentes concentrações de HAp. As MEVs mostraram osteoblastos com bordas dorsais em íntimo contato umas com as outras, conectadas por filopódios e dispostos em multicamadas. Sobre as coberturas com maior concentrações de HAp há a presença de células em processo mitótico. LEE et al., (2011) em seu estudo mostraram MEVs de células da linhagem MC3T3-E1 cultivadas sobre o Ti recoberto por HAp e controle após um dia de incubação. As imagens mostraram que as células apresentavam certa confluência e morfologia alongada. As células cultivadas sobre a cobertura de HAp estavam anexadas à cobertura e espalhadas por filopódios, enquanto as células do controle ainda apresentavam formas arredondadas.

ROUAHI et al. (2006) mostraram MEVs de células da linhagem Saos-2 (células osteoblásticas) cultivadas de 30 minutos a 3 dias sobre o Ti limpo e sobre coberturas de HAp moldada (HAp_m) e prensada (HAp_p). Nas coberturas de HAp, as células estavam completamente espalhadas e com as protuberâncias do núcleos ainda bem evidentes. No entanto, a morfologia observada nos osteoblastos crescidos sobre as coberturas de HAp foi radicalmente diferente do que nas outras superfícies, com as bordas citoplasmáticas

praticamente indistinguíveis da superfície. As microscopias mostradas por ROUAHI et al. (2006) estão de acordo com as apresentadas neste trabalho, mostrando que com o aumento da hidrofilicidade e da concentração de HAp pode-se encontrar células com padrões de espalhamento diferentes dos controles.

Diferenças entre as MEVs mostradas nos estudos podem ser devida a nãooestruturação das superfícies, e os diferentes modelos celulares utilizados, em comparação aos utilizados nesta pesquisa. Em adição, a literatura relata que a presença de íons Ca^{2+} podem mediar a agregação dos osteoblastos e sua comunicação via junções de comunicação GAP (ANSELME, 2000; FENG et al., 2004), e a dissolução das coberturas ricas em HAp no meio de cultura pode estimular estas funções.

Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura de culturas de osteoblastos na ampliação de 1000X e 3000X, ao 14° e 21° dias de cultura. As setas vermelhas indicam os osteoblastos, as amarelas apontam os cristais de HAp, e as azuis indicam as fibras de colágeno. **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti+OPA/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de OPA e HAp. **Ti+DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp.

5.1.9 Microscopia confocal

A Figura 18 mostra as microscopias confocais das culturas de osteoblastos crescidos sobre o Ti, Ti+DHP/HAp e Ti+OPA/HAp tanto ao 14° quanto ao 21° dia. Os osteoblastos foram corados com laranja de acridina (setas vermelhas) que possui a habilidade de corar ácidos nucleicos em duas diferentes tonalidades, sendo a coloração verde no núcleo celular, e a alaranjada no citoplasma (JONES et al., 2005).

As imagens ao 14° dia (Fig.18.a-c) mostraram que os osteoblastos se aderem favoravelmente tanto no CT quanto nas coberturas testadas, exibindo extensões citoplasmáticas. As células cultivadas sobre o CT (Fig.18.a) aparentam uma maior polarização (crescimento alinhado em duas direções) do sentido do crescimento, enquanto os osteoblastos crescidos sobre as coberturas de Ti+DHP/HAp (Fig.18.b) e Ti+OPA/HAp (Fig.18.c) não possuíam uma polarização das culturas (crescimento desordenado) e aparentemente estão em maior número por campo, quando comparados ao Ti limpo. O número exato de osteoblastos por campo não pode ser estimado devido à sobreposição de diversas camadas de células (células estratificadas).

As Fig.18.d, 18.e e 18.f mostram os osteoblastos após 21 dias de cultura, em um avançado estágio de senescência e morte. As delimitações do citoplasma e núcleo são menos evidentes que ao 14° dia, e a coloração já não assume a mesma tonalidade da encontrada ao 14° dia de crescimento. Pode-se observar a presença de células intactas tanto no Ti+DHP/HAp e no Ti+OPA/HAp, enquanto no CT visualiza-se um processo mais avançado de morte.

SHI et al. (2009) avaliaram o efeito do tamanho de partículas de HAp micro e nanoestruturadas na proliferação e apoptose de células da linhagem MG-63 (similares a osteoblastos) e suas microscopias confocais com laranja de acridina foram realizadas ao 5° dia de cultivo em uma magnitude menor do que a mostrada no presente trabalho. Suas imagens

somente mostraram uma diminuição do número de células com o aumento do tamanho das partículas em comparação às células crescidas sobre o vidro, no entanto características morfológicas mais complexas não foram possíveis de se observar em tal ampliação.

RAGHAVENDRAN et al. (2014) realizou microscopias confocais em osteoblastos diferenciados de células mesenquimais estromais humanas, coradas com laranja de acridina e azul de Hoechst, e cultivadas sobre arcabouços de ácido poli L-lático/HAp/colágeno (PLLA/HA/Col, PLLA/HA, e PLLA/Col). As imagens mostraram extensões citoplasmáticas e vilosidades claramente visíveis, evidenciando a adesão celular. As células crescidas sobre o PLLA/HA/Col apresentaram uma arquitetura definida com região citoplasmática e nuclear delimitada. No entanto, as células crescidas sobre o PLLA/HA, e PLLA/Col aparentaram estar alteradas, com desidade reduzida de células.

LIANG et al. (2015) avaliaram a compatibilidade do Ti modificado pela técnica de deposição-implantação de íons de zinco à culturas de células da linhagem MG-63 (osteosarcoma humano). Estas células foram crescidas sobre as coberturas de Zn-Ti e coradas com laranja de acridina em tempos de 20, 40 e 60 min de cultura, para a avaliação da adesão inicial ao biomaterial. As microscopias confocais evidenciaram um aumento no número de células para todas as amostras testadas com o passar do tempo.

Tanto as imagens de MEV quanto as MC realizados na presente pesquisa confirmaram que as coberturas compactas de filmes LB estimulam a proliferação dos osteoblastos, mas somente a cobertura de Ti+DHP/HAp é capaz de aumentar a biomineralização.

Figura 18. Imagens de microscopia confocal das culturas de osteoblastos ao 14º e 21º dias. As setas vermelhas indicam os osteoblastos.

Ti: Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti+OPA/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de OPA e HAp. **Ti+DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp.

5.2 SEGUNDA FASE DE EXPERIMENTOS

Para uma melhor compreensão da sequência de experimentos realizados nesta etapa da tese de Doutorado, os resultados e discussão foram divididos em 3 partes:

- Osteoblastos crescidos sobre coberturas de lipídios e PTH
- Atuação do PTH nos osteoblastos crescidos sobre a placa de cultura e Ti
- Utilização das coberturas de Ti+DHP/HAp como sistema de liberação de PTH

OSTEOBLASTOS CRESCIDOS SOBRE COBERTURAS DE LIPÍDIOS, HAP E PTH

5.2.1 Isotermas de π vs área por molécula e módulo compressional (Cs^{-1})

Foram realizados testes iniciais para a utilização do PTH adsorvido no Ti juntamente aos filmes de lipídios DHP e DPPC pela técnica de formação dos filmes LB, almejando a produção de um biomaterial. Estes fosfolipídios foram escolhidos pois o DHP se mostrou eficiente na fabricação dos biomateriais na primeira fase dos experimentos, e o DPPC foi escolhido pois a fosfatidilcolina é um dos principais glicerofosfolípidos presentes nas membranas eucarióticas (VAN MEER; DE KROON, 2011). O DPPC é uma molécula zwitteriônica, com carga líquida igual a zero.

Isotermas foram obtidas a $25,0 \pm 1^\circ\text{C}$ utilizando como subfase a água Mili Q[®] para ambos os lipídios DPPC e DHP. Volumes adequados das soluções clorofórmicas dos lipídios foram espalhados nas superfícies das subfases, em uma Cuba de Langmuir. Para estudar o efeito da incorporação do PTH nas monocamadas, 50 μL de solução a 0,5 mg/mL foram injetadas na subfase aquosa. A área média ocupada por molécula na fase condensada foi

calculada graficamente pelo ajuste de uma tangente aos pontos que correspondem ao estado LC da monocamada.

A Figura 19.a mostra as isotermas π -A para o DPPC em subfase contendo água (linha preta) e em subfase de água contendo solução de PTH (linha vermelha). O aumento da área média por molécula de $57,1 \pm 0,9 \text{ \AA}^2$ para $68,1 \pm 1,2$ (16%) pode ser atribuída à inserção do PTH neste filme. Este fato pode ser explicado pela migração do PTH para a interface, evidenciando a sua interação com este fosfolípido. Analisando o potencial zeta da molécula de PTH em pH 7,4 foi encontrado o valor negativo de -14,9 mV, o que explica sua possível interação com o grupo colina, positivamente carregado, da cabeça polar do DPPC.

A Figura 19.b mostra o módulo compressional (C_s^{-1}) para isotermas de DPPC puro e na presença de PTH, que foi calculado diretamente a partir da Equação 2. O valor de C_s^{-1} máximo foi aumentado em presença de PTH, indicando aumento de rigidez da monocamada causado pela presença do fragmento de hormônio. Ainda, este máximo foi deslocado para maiores valores de área, comparado ao DPPC puro.

A Figura 20.a mostra as isotermas π -A para o DHP em subfase contendo água (linha preta) e em subfase de água contendo solução de PTH em concentração de 50 μL de solução a 0,5 mg/mL. O aumento da área mínima por molécula de $42,5 \pm 1,2$ para $45,5 \pm 0,9 \text{ \AA}^2$ (5,5%), foi muito menor comparado ao aumento de 16% do DPPC.

A Figura 20.b mostra o módulo compressional (C_s^{-1}) do DHP puro e na presença de PTH, calculado a partir da inclinação da curva $\pi - A$ (Figura 19.a).

Pode-se notar que a adsorção do PTH 1-34 à membrana lipídica é dependente do fosfolípido utilizado. Enquanto o DPPC em presença do PTH 1-34 mostra um notável aumento da área média por molécula, o DHP não apresenta o mesmo padrão. Este fato pode

ser devido às diferentes cargas presentes. O DPPC possui a colina em sua composição com carga positiva, que pode interagir com o PTH 1-34 de carga negativa, mostrado pela medida do potencial-zeta. Já o DHP possui carga negativa pela presença do grupo fosfato, o que pode causar repulsão da molécula de PTH 1-34. As alterações na elasticidade da monocamada também foi mais sutil (Fig. 20.b). A rigidez foi diminuída, e a monocamada torna-se mais compressível (menor Cs^{-1} máximo) em presença do PTH. O máximo ocorre nos mesmos valores de área.

Figura 19. a) Isotermas de π vs área por molécula de DPPC obtidas sobre água pura (linha preta) e sobre água contendo 50 μL da solução de PTH a 0,5 mg/mL (linha vermelha).

b) Módulo compressional (C_s^{-1}) do DPPC sobre água pura (linha preta) e sobre água contendo 50 μL da solução de PTH a 0,5 mg/mL (linha vermelha).

Figura 20. a) Isotermas de π vs área por molécula de DHP obtidas sobre água pura (linha preta) e sobre água contendo 50 μL da solução de PTH a 0,5 mg/mL (linha vermelha).

b) Módulo compressional (C_s^{-1}) do DHP sobre água pura (linha preta) e sobre água contendo 50 μL da solução de PTH a 0,5 mg/mL (linha vermelha).

5.2.2 Microbalança de cristal de quartzo (QCM)

A massa de lipídio e de PTH adsorvido no cristal de quartzo por bicamada foi quantificada por meio da técnica de QCM. 50 μL da solução de PTH a 0,5 mg/mL foi adicionado à subfase de água contendo as soluções de DPPC ou DHP. A transferência para o cristal de quartzo foi realizada mantendo a π constante a 30 mN/m e velocidade de imersão/emersão de 0,038 mm/s.

A Tabela 4 mostra a média das massas adsorvidas de DPPC, DHP, DPPC+PTH e DHP+PTH. Pode-se notar que a massa de PTH adsorvida no filme de DPPC é 2,5 vezes maior do que no filme de DHP. Estes dados corroboram os resultados mostrados pelas isotermas (Fig.19.a e Fig.20.a).

Tabela 4. Médias das massas dos fosfolipídios DHP e DPPC e do PTH depositados em cristal piezoelétrico de quartzo

Médias QCM			
	Δf	m (ng)	PTH (ng)
DHP	131,5	$192,3 \pm 10,4$	
DHP PTH	151,5	$221,6 \pm 8,1$	29,3
DPPC	147,5	$215,8 \pm 9,5$	
DPPC PTH	197,0	$288,3 \pm 5,9$	72,5

5.2.3 Viabilidade celular

A Figura 21.a mostra a viabilidade celular dos osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura sobre o Ti limpo (Ti), sobre o Ti recoberto com 2 camadas de filmes de DHP (Ti/DHP) e sobre o Ti recoberto com filme de DHP contendo 50 µL solução de PTH a 0,5 mg/mL na subfase aquosa da cuba de Langmuir (Ti/DHP+PTH). Em todos os dias de cultura testados, tanto a cobertura de Ti/DHP quanto a de Ti/DHP+PTH diminuíram a viabilidade dos osteoblastos quando comparados ao Ti.

Já a Figura 21.b mostra a viabilidade celular dos osteoblastos sobre o Ti limpo (Ti), sobre o Ti recoberto com filme de DPPC na cuba de Langmuir (Ti/DPPC) e sobre o Ti recoberto com filme de DPPC contendo 50 µL solução de PTH a 0,5 mg/mL na subfase aquosa da cuba de Langmuir (Ti/DPPC+PTH). Estas coberturas também diminuíram a viabilidade dos osteoblastos quando comparados ao Ti em todos os dias testados.

A literatura mostra que coberturas de lipídios na ausência de HAp diminuem a adesão dos osteoblastos ao Ti recoberto, diminuindo assim a sua viabilidade (DE SOUZA et al., 2014). Este fato pode ser devido à diminuição da energia superficial e molhabilidade do Ti recoberto pelos lipídios em comparação ao Ti limpo. A presença do PTH na concentração testada não contribuiu para uma melhora da viabilidade celular, sendo que esta foi estatisticamente semelhante à cobertura dos lipídios sozinhos. Este tipo de cobertura se mostrou menos eficaz em estimular a proliferação osteoblástica do que o Ti limpo em todos os dias testados.

Figura 21. Viabilidade celular de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como porcentagem da média de três experimentos realizados em triplicata, comparado ao controle (100%). * $p < 0,05$ vs controle de Ti.

a) **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti/DHP:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP na cuba de Langmuir. **Ti/DHP+PTH:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP contendo 50 µL solução de PTH a 0.5 mg/mL na subfase aquosa da cuba de Langmuir.

b) **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti/DPPC:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DPPC na cuba de Langmuir. **Ti/DPPC+PTH:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DPPC contendo 50 µL solução de PTH a 0.5 mg/mL na subfase aquosa da cuba de Langmuir.

5.2.4 Formação da matriz mineralizada

A Figura 22.a mostra a formação da matriz mineralizada dos osteoblastos ao 14º e 21º dias de cultivo sobre o Ti, Ti/DHP e Ti/DHP+PTH. E a Figura 22.b mostra a formação da matriz mineralizada sobre o Ti, Ti/DPPC e Ti/DPPC+PTH.

Em todos os dias de cultura testados, tanto as coberturas de Ti/DHP, Ti/DHP+PTH e Ti/DPPC, Ti/DPPC+PTH diminuíram a formação da matriz mineralizada dos osteoblastos quando comparados ao Ti em todos os dias testados. Estes resultados estão correlacionados com a diminuição da viabilidade celular, que também foi prejudicada com as coberturas de lipídios. Com uma menor adesão e proliferação das células sobre a superfície revestida, o amadurecimento dos osteoblastos, e consequentemente a formação dos nódulos de HAp foram comprometidos.

Estudos tem mostrado a utilização de fosfolipídios na fabricação de biomateriais, devido à sua habilidade de mimetizar a superfície das células e MVs (BOSETTI et al., 2007), sendo que esta última contém fosfolipídios associados ao processo de mineralização. As MVs estão envolvidas na formação inicial de cristais de HAp pela interação dos íons cálcio e fosfato com os seus fosfolipídios ácidos, e seu interior oferece um microambiente favorável para facilitar o início da mineralização (SIMÃO et al., 2010a; WUTHIER; LIPSCOMB, 2011).

A literatura não descreve a formação de matriz mineralizada por osteoblastos sobre cobertura de lipídios, somente cita dados sobre a viabilidade celular (DE SOUZA et al., 2014). Contudo, apesar da falta de descrição acerca da mineralização sobre coberturas de lipídios, este teste é de fundamental importância, visto que a característica mais importante de um novo material ortopédico é a capacidade de promover a osteointegração, que pode ser

definida como a conexão estrutural e funcional direta entre o osso em formação e a superfície do material (BOSETTI et al., 2007).

Levando-se em conta os resultados da viabilidade e da mineralização osteoblástica deste estudo, concluímos que os fosfolipídios DHP e DPPC não se mostraram eficientes para o desenvolvimento de coberturas de Ti tanto sozinhos, quanto em conjunto com o PTH.

Figura 22. Formação da matriz mineralizada de cultura de osteoblastos ao 14º e 21º dias. O resultado foi expresso como a média da absorbância de três experimentos realizados em triplicata *p<0,05 vs controle de Ti.

a) **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti/DHP:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP na cuba de Langmuir. **Ti/DHP+PTH:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP contendo 50 μ L solução de PTH a 0.5 mg/mL na subfase aquosa da cuba de Langmuir.

b) **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti/DPPC:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DPPC na cuba de Langmuir. **Ti/DPPC+PTH:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DPPC contendo 50 μ L solução de PTH a 0.5 mg/mL na subfase aquosa da cuba de Langmuir.

ATUAÇÃO DO PTH NOS OSTEOLASTOS CRESCIDOS SOBRE A PLACA DE CULTURA E TI

Como já citado anteriormente, o PTH tem a habilidade tanto de estimular quanto de inibir o crescimento dos osteoblastos dependendo da sua concentração e modo de exposição às células. Nesta parte da Tese foi testada a atuação do PTH 1-34 nos osteoblastos crescidos diretamente sobre a placa de cultura e sobre o Ti em comparação a seus respectivos controles. A solução de PTH somente foi adicionada à primeira troca de meio de cultura por 24 horas, devido aos experimentos *in vivo* mostrarem que injeções diárias de PTH (com intervalos de 24hrs) são estimuladores do aumento da massa óssea (HODSMAN et al., 2005; JILKA et al., 2009). As trocas seguintes somente continham o meio de cultura suplementado para o crescimento osteoblástico. Esta parte do estudo foi de extrema importância para a compreensão dos efeitos do PTH isolado da cobertura de HAp que será mostrada posteriormente, garantindo que a concentração testada não causaria um efeito inibitório/tóxico nas culturas de osteoblastos.

5.2.5 Viabilidade celular

A Figura 23 mostra a viabilidade celular de osteoblastos crescidos em meio de cultura contendo concentrações de PTH de 10, 20, 50, 70 e 100 ng/mL. A partir da concentração de 100 ng/mL observou-se uma diminuição da viabilidade dos osteoblastos, tanto ao 7º quanto ao 14º dia de cultivo. A concentração de escolha para a continuação dos testes foi de 50 ng/mL pela sua descrição na literatura como estimuladora da osteogênese (ISHIZUYA et al., 1997; JILKA, 2007).

Na Figura 24 pode-se observar a viabilidade celular dos osteoblastos crescidos sobre o CT, Ti, com adição da solução de PTH na concentração de 50 ng/mL ao meio de cultura sobre a placa de cultivo (PTH), e com adição da solução de PTH na concentração de 50 ng/mL ao meio de cultura sobre o Ti (Ti PTH). Ao 7º dia de cultivo, pode-se observar que não houve diferença estatística da viabilidade dos osteoblastos crescidos sobre o PTH quando comparado ao CT, nem dos osteoblastos crescidos sobre o Ti PTH quando comparado ao Ti. Ao 14º dia de cultivo, não houve diferença estatística da viabilidade dos osteoblastos crescidos sobre o PTH quando comparado ao CT, no entanto houve uma diminuição da viabilidade dos osteoblastos crescidos sobre o Ti PTH quando comparado ao Ti. Já ao 21º dia de cultivo, não houve diferença na viabilidade para nenhum dos parâmetros testados quando comparados aos respectivos controles.

A literatura cita que concentrações de PTH de 50 ng/mL pode tanto estimular a diferenciação de osteoblastos quando inibir a atividade da ALP e a proliferação, dependendo do tempo e modo de exposição ao hormônio. Exposições intermitentes e longas estimulam a proliferação e exposições contínuas ou intermitentes curtas inibem o crescimento dos osteoblastos (ISHIZUYA et al., 1997). O mecanismo de ação do PTH no tecido ósseo ainda não é completamente compreendido, mas estudos sugerem que o PTH estimula múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo aquelas mediadas por AMPc e cálcio, e ativa tanto a proteína quinase A e a proteína quinase C (ISHIZUYA et al., 1997).

O modo de exposição do PTH aos osteoblastos nesta fase dos experimentos tentou mimetizar o modo como foi testado na cultura de células, mostrando que apesar de não estimular a proliferação da cultura de osteoblastos, não inibiu o seu crescimento como mostrado em exposições contínuas nesta mesma concentração (ISHIZUYA et al., 1997).

LIU e colaboradores (2015) testaram o efeito do PTH bovino na viabilidade de células da linhagem MC3T3-E1. Estas células foram expostas continuamente a concentrações de 100, 10, 1 ou 0,1 ng/mL de PTH por 20 dias consecutivos e seus resultados mostraram uma diminuição significativa da viabilidade celular em todas as concentrações testadas a partir do 7º dia, quando comparados ao controle sem PTH. Quando as células foram tratadas com PTH 100 ng/mL por 10 dias, seguidos por mais 10 dias de cultivo sem o estímulo, houve inicialmente uma diminuição da viabilidade, seguida pela sua recuperação a partir do 10º dia com a retirada do PTH. Este dado está parcialmente de acordo com os resultados encontrados nesta pesquisa, onde concentrações de 100 ng/mL mostraram diminuir a viabilidade dos osteoblastos.

Figura 23. Viabilidade celular de osteoblastos ao 7º e 14º dias de cultura com concentrações de PTH. O resultado foi expresso como porcentagem da média de três experimentos realizados em triplicata, comparado ao controle (100%). * $p < 0,05$ vs controle de Ti.

Figura 24. Viabilidade celular de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como porcentagem da média de três experimentos realizados em triplicata, comparado ao controle (100%). * $p < 0,05$ vs controle de Ti.

CT: Osteoblastos crescidos em meio de cultura diretamente sobre a placa de cultivo. **PTH:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura contendo 50 ng/mL da solução de PTH. **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti PTH:** Osteoblastos crescidos sobre o Ti em meio de cultura contendo 50 ng/mL da solução de PTH.

5.2.6 Proteína total, concentração de colágeno e atividade da ALP

A Figura 25 mostra a dosagem de proteína total ao 7º, 14º e 21º dias de cultura dos osteoblastos crescidos sobre o CT, Ti, PTH, e Ti PTH. Ao 7º dia de cultivo não houveram modificações estatísticas entre os parâmetros testados. O mesmo ocorreu quando comparados ao 14º dia de cultivo e ao 21º. Já a Figura 26 mostra a concentração de colágeno das culturas de osteoblastos crescidas sobre o CT, Ti, PTH, e Ti PTH, ao 7º, 14º e 21º dia. Assim como os resultados da dosagem total de proteínas, a concentração de colágeno não variou ao 7º, 14º e ao 21º dia quando comparados aos seus controles. Somente houve a variação natural da concentração de colágeno do 7º ao 21º dia entre a mesma amostra, devido ao aumento do número de osteoblastos e consequentemente de suas proteínas, como o colágeno.

A Figura 27 mostra que a atividade da enzima ALP dos osteoblastos crescidos sobre o CT, Ti, PTH, e Ti PTH também não variou em comparação aos seus respectivos controles tanto ao 7º, 14º e 21º dias de cultivo. ISHIZUYA e colaboradores (1997) testaram a atividade da ALP de células de osteoblastos isoladas de calvária de ratos recém-nascidos estimuladas com diversas concentrações de PTH de forma contínua por 48 horas, ou de forma intermitente, com ciclos de 1, 3, 6 e 24 horas, em ciclos de troca de meio de cultura a cada 48 horas. Seus resultados mostraram que incubações contínuas de PTH diminuem a atividade da ALP, enquanto incubações de 3 e 24 horas mantêm a sua atividade e incubações de 6 horas estimulam a atividade da ALP. Nossos resultados estão de acordo com este autor, pois o estímulo de 24 horas com o PTH mostrou não inibir a atividade da ALP. Este estudo também demonstrou que a exposição contínua dos osteoblastos ao PTH também diminui a expressão de RNA mensageiro de procolágeno I α 1, comparado ao controle sem PTH.

LOSSDÖRFER et al. (2006) analisou a atividade da ALP de células de ligamentos periodontais humanos estimulados com PTH 1-34 por até 24 horas, em três ciclos de

incubação de 48 horas cada. Este estudo mostrou que culturas confluentes estimuladas por 24 horas com concentrações de 10^{-8} mol/L de PTH tem a atividade da ALP aumentada, enquanto concentrações de 10^{-12} mol/L e 10^{-7} mol/L não modificaram a atividade quando comparado ao controle sem PTH.

Figura 25. Dosagem de proteína total de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como a média de três experimentos realizados em triplicata.

CT: Osteoblastos crescidos em meio de cultura diretamente sobre a placa de cultivo. **PTH:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura contendo 50 ng/mL da solução de PTH. **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti PTH:** Osteoblastos crescidos sobre o Ti em meio de cultura contendo 50 ng/mL da solução de PTH.

Figura 26. Dosagem da concentração de colágeno de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como a média de três experimentos realizados em triplicata.

CT: Osteoblastos crescidos em meio de cultura diretamente sobre a placa de cultivo. **PTH:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura contendo 50 ng/mL da solução de PTH. **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti PTH:** Osteoblastos crescidos sobre o Ti em meio de cultura contendo 50 ng/mL da solução de PTH.

Figura 27. Atividade da fosfatase alcalina dos osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como a média de três experimentos realizados em triplicata.

CT: Osteoblastos crescidos em meio de cultura diretamente sobre a placa de cultivo. **PTH:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura contendo 50 ng/mL da solução de PTH. **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti PTH:** Osteoblastos crescidos sobre o Ti em meio de cultura contendo 50 ng/mL da solução de PTH.

5.2.7 Formação da matriz mineralizada

A formação da matriz mineralizada pelos osteoblastos crescidos ao 14º e 21º dia de cultura sobre o CT, Ti, PTH, e Ti PTH está evidenciada na Figura 28. Pode-se notar que não houve diferença entre a formação de nódulos mineralizados das culturas estimuladas com o PTH quando comparado ao Ti, e também das culturas crescidas sobre o Ti PTH em comparação ao Ti. Este resultado correlaciona com a sua viabilidade e a atividade da ALP, que estão diretamente ligados à formação da matriz mineralizada. O resultado encontrado está de acordo com (ISHIZUYA et al., 1997), que testou a formação da matriz mineralizada de células osteoblásticas isoladas de calvária de ratos recém-nascidos estimuladas com diversas concentrações de PTH de forma contínua por 48 horas, ou de forma intermitente, com ciclos de 1, 3, 6 e 24 horas, em ciclos de troca de meio de cultura a cada 48 horas. Seus resultados mostraram que incubações por 24 horas com PTH tem a capacidade de manter a mesma formação de matriz mineralizada *in vitro* que o CT, enquanto que a exposição contínua de PTH diminui a formação dos nódulos de minerais.

LIU et al., (2015) analisou a formação de nódulos de mineralização de células da linhagem MC3T3-E1 (precursora de osteoblastos) estimuladas com PTH bovino em concentrações contínuas de 0,1 e 100 ng/mL por 20 dias, ou em ciclos de exposição de 10 dias com a concentração de 100 ng/mL seguido por 10 dias sem estímulo. Seus resultados mostraram que o PTH induziu diferentes efeitos no número de nódulos mineralizados dependendo do tempo de exposição e concentração. A concentração de 0,1 ng/mL induziu mais a formação de nódulos minerais comparado à concentração de 100 ng/mL, no entanto, menos que o grupo controle. A cultura celular exposta aos ciclos de PTH 100 ng/mL também formaram menos nódulos em comparação ao controle. Os resultados diferem dos encontrados

nesta pesquisa. A diferença na concentração, no tempo de exposição e a linhagem celular mostraram ser os fatores principais desta diferença.

Os resultados mostrados evidenciaram que a concentração de PTH utilizada e o tempo de incubação são seguros para manter a integridade dos parâmetros de biomineralização *in vitro* das culturas primárias de osteoblastos como a viabilidade, atividade da ALP e formação da matriz mineralizada. No entanto, estes resultados não podem ser comparados à atividade da mesma concentração de PTH em animais ou em humanos realizada de forma injetável diária, pois há a influência de inúmeros fatores metabólicos resultantes das outras células do tecido ósseo (como por exemplo, os osteoclastos) e estímulos que contribuem para a perfeita resposta do aumento da densidade mineral óssea. O resultado isolado do estímulo do PTH a uma única linhagem celular ainda é um modelo pobre, comparado à complexidade do tecido ósseo.

Figura 28. Formação da matriz mineralizada de cultura de osteoblastos ao 14º e 21º dias. O resultado foi expresso como a média da absorbância de três experimentos realizados em triplicata.

CT: Osteoblastos crescidos em meio de cultura diretamente sobre a placa de cultivo. **PTH:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura contendo 50 ng/mL da solução de PTH. **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti PTH:** Osteoblastos crescidos sobre o Ti em meio de cultura contendo 50 ng/mL da solução de PTH.

UTILIZAÇÃO DAS COBERTURAS DE TI+DHP/HAP COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE PTH

O uso de dispositivos para a liberação local de drogas tem sido muito estudado devido ao fato de poder reduzir o número e a intensidade dos efeitos colaterais, melhorar a eficácia das drogas existentes e abrir as portas para uma classe inteira de novos tratamentos (VERRON et al., 2010). A incorporação de agentes terapêuticos em materiais inorgânicos utilizados em implantes como os fosfatos de cálcio, tem sido alvo de estudos devido à sua similaridade ao sistema ósseo e consequentemente, maior facilidade em introduzi-los no organismo. Atualmente, os esforços da ciência dos biomateriais estão focados em desenvolver sistemas mistos, que combinem materiais substitutos do sistema ósseo com moléculas ativas, com o intuito de unir a melhora do potencial osteogênico dos implantes com os benefícios de administração local de drogas, como por exemplo o PTH.

Neste capítulo foi testada a capacidade de utilizar o biomaterial composto pelo Ti recoberto de DHP/HAp como um sistema de liberação de PTH, testando a sua eficiência em liberar o hormônio de forma localizada e ainda continuar a estimular a proliferação óssea de maneira sinérgica.

5.2.8 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é comumente utilizada em sistemas semelhantes ao tecido ósseo (KAZARIAN; CHAN, 2013). Esta técnica possibilita a obtenção de informações sobre os minerais e proteínas de forma rápida e não-destrutiva (BOSKEY; PLESHKO CAMACHO, 2007).

Diversos trabalhos utilizando materiais à base de HAp apresentam bandas de absorção no infravermelho similares às obtidas para o osso, como mostrado na Figura 29.

Figura 29. Espectro de absorção no infravermelho da amostra de osso humano. Adaptado de RUIZ (2015).

Os principais grupos identificados nos trabalhos descritos na literatura são: os modos de vibração do fosfato ν_1 e ν_3 na região de 900-1180 cm⁻¹ e ν_4 em 604 cm⁻¹; do carbonato ν_4 em 960 cm⁻¹ e ν_2 na região de 1560-1410 cm⁻¹. Banda de absorção da amida I (1680-1600 cm⁻¹) e amida II (1580-1480 cm⁻¹), e o estiramento do grupo O-H presente perto de 3500 cm⁻¹.

A Figura 30 mostra o espectro de absorção no infravermelho da amostra de Ti recoberto com DHP/HAp (linha preta) e Ti recoberto com DHP/HAp+PTH (linha vermelha) na mesma concentração colocada na cultura celular. Os espectros obtidos são semelhantes ao obtido para o osso humano (Fig. 29), comprovando a similaridade composicional entre eles. A

ausência da banda intensa na região de 1600 cm^{-1} , atribuída à ligação amida I, está relacionada à ausência de colágeno nestes filmes.

Quando compara-se o espectro de absorção do DHP/HAp (linha preta) ao DHP/HAp+PTH (linha vermelha), vemos que os espectros se sobrepõem, não evidenciando nenhuma banda diferente apesar da presença do PTH. Este fato pode ser devido à baixa concentração do PTH quando comparado à alta concentração da HAp.

Figura 30. Espectro de absorção no infravermelho da amostra de Ti recoberto com DHP/HAp (linha preta) e Ti recoberto com DHP/HAp+PTH (linha vermelha)

5.2.9 Viabilidade celular

A Figura 31 mostra o resultado da viabilidade celular das culturas primárias de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dia de cultivo sobre o Ti limpo, Ti DHP/HAp, Ti DHP/HAp com solução de PTH gotejado sobre a superfície (concentração de PTH na primeira adição de meio de cultura: 50 ng/mL = Ti HAp/PTH G), e sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp, em meio de cultura contendo 50 ng/mL de PTH em todas as trocas (Ti HAp/PTH S).

Ao 7º dia de cultivo houve um aumento da viabilidade celular dos osteoblastos crescidos sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e Ti HAp/PTH S quando comparados ao controle de Ti limpo. No entanto não houve diferença significativa da viabilidade entre as coberturas. Ao 14º dia, a viabilidade dos osteoblastos crescidos sobre coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e Ti HAp/PTH S foram superiores ao Ti limpo, sendo que destes, a viabilidade dos osteoblastos crescidos sobre o Ti HAp/PTH G foi significativamente maior que as outras duas coberturas citadas. Ao 21º dia de cultivo quando comparados ao Ti, houve também um aumento significativo da viabilidade entre as células crescidas sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e Ti HAp/PTH S. No entanto, também não observou-se nenhuma diferença significativa entre elas.

Não há dados na literatura descrevendo a viabilidade de culturas osteoblásticas crescidas sobre o Ti recoberto com HAp e PTH. No entanto, KAMO et al. (2010) estudaram os efeitos *in vivo* da reconstrução de defeitos ósseos de ratas ovariectomizadas com blocos de HAp, enquanto eram administradas injeções intermitentes de PTH 1-34. Este estudo mostrou que os animais que receberam as injeções tiveram um aumento significativo do volume ósseo e da razão de formação óssea quando comparadas às ratas na mesma condição que não receberam as injeções de PTH, evidenciando que houve um aumento do número de células ósseas e da mineralização *in vivo*.

Figura 31. Viabilidade celular de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como porcentagem da média de três experimentos realizados em triplicata, comparado ao controle (100%). * $p < 0,05$ vs controle de Ti.

Ti: Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp. **TI HAp/PTH G:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp com solução de PTH gotejado sobre a superfície (concentração de PTH na primeira adição de meio de cultura: 50 ng/mL). **TI HAp/PTH S:** Osteoblastos crescidos sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp, em meio de cultura contendo 50 ng/mL de PTH em todas as trocas.

5.2.10 Proteína total, concentração de colágeno e atividade da ALP

A Figura 32 mostra o resultado da dosagem de proteína total das culturas primárias de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultivo sobre o Ti, Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G, e sobre o Ti HAp/PTH S.

Pode-se observar ao 7º dia de cultivo que as células crescidas sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e Ti HAp/PTH S aumentaram seu conteúdo proteico em comparação ao Ti limpo, mas não houve diferença estatística entre elas. Ao 14º dia de cultivo também houve um aumento da concentração de proteínas das células crescidas sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e Ti HAp/PTH S quando comparados ao Ti, mas sem diferença estatística entre elas. O mesmo padrão anterior foi observado ao 21º dia de cultivo.

A Figura 33 mostra o resultado da dosagem da concentração de colágeno das culturas de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dia de cultivo sobre o Ti, Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G, e sobre o Ti HAp/PTH S.

Ao 7º dia de cultivo não houve diferença significativa entre a produção de colágeno das células crescidas sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e Ti HAp/PTH S quando comparados ao Ti. Ao 14º dia de cultivo, houve uma diminuição da concentração de colágeno dos osteoblastos crescidos sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e sobre o Ti HAp/PTH S quando comparados ao Ti, mas não houve diferença estatística entre elas. Contudo, ao 21º dia de cultivo houve uma elevação significativa da concentração de colágeno das células crescidas sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e Ti HAp/PTH S comparado ao Ti, sem diferença significativa entre elas.

A Figura 34 mostra a atividade da enzima ALP produzida pelas culturas de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dia de cultivo em meio de cultura sobre o Ti, Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G, e sobre o Ti HAp/PTH S.

Ao 7º dia de cultivo não houve diferença estatística da atividade da ALP dos osteoblastos crescidos sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e Ti HAp/PTH S quando comparados ao controle de Ti limpo. Ao 14º dia, a atividade da ALP dos osteoblastos crescidos sobre coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e Ti HAp/PTH S foram superiores ao Ti limpo, sem diferença estatística entre elas. Ao 21º dia de cultivo também não houve diferença estatística da atividade da ALP dos osteoblastos crescidos sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e Ti HAp/PTH S quando comparados ao Ti.

Figura 32. Dosagem de proteína total de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como a média de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle de Ti.

Ti: Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp. **TI HAp/PTH G:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp com solução de PTH gotejado sobre a superfície (concentração de PTH na primeira adição de meio de cultura: 50 ng/mL). **TI HAp/PTH S:** Osteoblastos crescidos sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp, em meio de cultura contendo 50 ng/mL de PTH em todas as trocas.

Figura 33. Dosagem da concentração de colágeno de osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como a média de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle de Ti.

Ti: Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp. **TI HAp/PTH G:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp com solução de PTH gotejado sobre a superfície (concentração de PTH na primeira adição de meio de cultura: 50 ng/mL). **TI HAp/PTH S:** Osteoblastos crescidos sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp, em meio de cultura contendo 50 ng/mL de PTH em todas as trocas.

Figura 34. Atividade da fosfatase alcalina dos osteoblastos ao 7º, 14º e 21º dias de cultura. O resultado foi expresso como a média de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle de Ti.

Ti: Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp. **TI HAP/PTH G:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp com solução de PTH gotejado sobre a superfície (concentração de PTH na primeira adição de meio de cultura: 50 ng/mL). **TI HAP/PTH S:** Osteoblastos crescidos sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp, em meio de cultura contendo 50 ng/mL de PTH em todas as trocas.

5.2.11 Formação da matriz mineralizada

A Figura 35 mostra o resultado da formação da matriz mineralizada pelos osteoblastos ao 14° e 21° dia de cultivo sobre o Ti, Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G, e sobre o Ti HAp/PTH S.

As culturas foram coradas com Vermelho de Alizarina, que possui alta afinidade por cálcio, e posteriormente a absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro a 405 nm. Ao 14° dia de cultivo houve um aumento da formação de matriz mineralizada nas culturas de osteoblastos crescidos sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e sobre o Ti HAp/PTH S quando comparados ao Ti. Houve um aumento significativo da formação da matriz mineralizada sobre a cobertura de Ti HAp/PTH G quando comparada às outras duas. Ao 21° dia de cultivo houve uma elevação significativa da formação de matriz mineralizada das células crescidas sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, Ti HAp/PTH G e Ti HAp/PTH S comparado ao Ti, e também houve um aumento significativo da formação da matriz mineralizada sobre a cobertura de Ti HAp/PTH G quando comparada às outras coberturas.

Não há também na literatura, dados sobre o cultivo *in vitro* de osteoblastos sobre o Ti recoberto por HAp e PTH. O conteúdo que mais se aproxima ao referido assunto são os estudos *in vivo* realizados por OFFERMANN et al., (2016) que analisou a reconstrução de ossos osteoporóticos de ratas ovariectomizadas com Ti recoberto por HAp/estrôncio, concomitantemente com injeções de PTH. Os resultados mostraram que houve um aumento significativo do volume ósseo, da espessura trabecular e da densidade conectiva quando comparado ao controle.

Figura 35. Formação da matriz mineralizada de cultura de osteoblastos ao 14º e 21º dias. O resultado foi expresso como a média da absorbância de três experimentos realizados em triplicata.

Ti: Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp. **TI HAp/PTH G:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp com solução de PTH gotejado sobre a superfície (concentração de PTH na primeira adição de meio de cultura: 50 ng/mL). **TI HAp/PTH S:** Osteoblastos crescidos sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp, em meio de cultura contendo 50 ng/mL de PTH em todas as trocas.

5.2.12 MEV e EDX

A Fig.36 mostra as imagens de MEV das amostras obtidas após 21 dias de cultura em ampliações de 1.000X e 10.000X. Os osteoblastos crescidos sobre o Ti limpo e sobre as coberturas de Ti DHP/HAp e Ti HAp/PTH G foram fixados com formol a 10% e desidratados em gradiente de álcool para a completa retirada do conteúdo orgânico, restando somente os nódulos de HAp.

As imagens de MEV mostram a cobertura do Ti com os cristais de HAp e a formação dos nódulos de mineralização. Elas evidenciam a diferença da concentração dos minerais sobre o Ti recoberto em comparação ao Ti limpo. Sugere-se que aumento da molhabilidade e energia superficial do Ti recoberto, assim como o prévio recobrimento com os cristais de HAp sejam os responsáveis pelo aumento da mineralização sobre os Ti recobertos. Pois a energia livre superficial é correlacionada às interações entre biomateriais e as células. Observa-se diferenças entre o padrão de mineralização dos osteoblastos sobre as coberturas de Ti DHP/HAp, que mostra a formação de nódulos de mineralização mais protuberantes, quando comparada ao Ti HAp/PTH G, onde os nódulos mostram-se mais achatados e espalhados pelo Ti.

Os nódulos minerais crescidos sobre o Ti limpo e sobre as coberturas de Ti DHP/HAp e Ti HAp/PTH G também foram analisados pela técnica do EDX ao 21º dia de cultura, a fim de garantir que o mineral formado pela mineralização osteoblástica é efetivamente HAp. A Fig.37 evidencia os picos de cálcio e fósforo vistos pela técnica e mostra a razão molar Ca/P das amostras. Uma vez que a razão molar de Ca/P presente na HAp ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é 1,67, todas as amostras testadas apresentaram razão molar similar à $1,67 \pm 0,17$.

Figura 36. Microscopia eletrônica de varredura dos nódulos minerais das culturas de osteoblastos ao 21º dia de cultura em ampliações de 1.000X e 10.000X. **Ti:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp. **Ti HAp/PTH G:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp com solução de PTH gotejado sobre a superfície (concentração de PTH na primeira adição de meio de cultura: 50 ng/mL).

Ti

Ti DHP/Hap

Ti Hap/PTH G

Figura 37. Análise por EDX das superfícies mineralizadas ao 21º dia de cultura de osteoblastos. Inserção: Tabela contendo os valores brutos das análises e a razão molar dos nódulos.

Ti: Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti DHP/Hap:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp. **TI HAp/PTH G:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp com solução de PTH gotejado sobre a superfície (concentração de PTH na primeira adição de meio de cultura: 50 ng/mL).

5.2.13 Microscopia confocal

A Figura 38 mostra as microscopias confocais das culturas de osteoblastos crescidos sobre o Ti limpo e sobre as coberturas de Ti DHP/HAp e Ti HAp/PTH G ao 14º e ao 21º dia de cultivo. Os osteoblastos (setas vermelhas) foram corados com laranja de acridina, que possui habilidade de corar ácidos nucleicos em duas diferentes tonalidades, sendo a coloração verde no núcleo celular (DNA), e a alaranjada no citoplasma (RNA) (JONES et al., 2005).

As imagens ao 14º dia (Fig.38.a-c) evidenciam o aparente aumento da concentração de osteoblastos nas coberturas de Ti DHP/HAp e Ti HAp/PTH quando comparados ao Ti. Todas as amostras exibiram extensões citoplasmáticas. O número exato de osteoblastos por campo não pode ser estimado devido à sobreposição de diversas camadas de células.

As Fig.38.d-f mostram os osteoblastos após 21 dias de cultura já em um avançado estágio de maturação. No entanto, as coberturas de Ti DHP/HAp e Ti HAp/PTH ainda mostram osteoblastos aparentemente mais intactos que o Ti limpo e em uma concentração mais alta por campo. As delimitações do citoplasma e núcleo ao 21º dia estão menos evidentes que ao 14º dia de cultivo, e a coloração já não assume a mesma tonalidade da encontrada ao 14º dia.

Figura 38. Imagens de microscopia confocal das culturas de osteoblastos ao 14º e 21º dias. As setas vermelhas indicam os osteoblastos.

Ti: Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti limpo. **Ti DHP/HAp:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp. **Ti HAp/PTH G:** Osteoblastos crescidos em meio de cultura sobre o Ti recoberto com filme de DHP e HAp com solução de PTH gotejado sobre a superfície (concentração de PTH na primeira adição de meio de cultura: 50 ng/mL).

A quantificação do PTH 1-34 liberado da cobertura não foi possível de ser realizada com os recursos disponíveis, devido à sua baixa concentração nos testes realizados. A tentativa de desenvolvermos uma curva de calibração empregando-se a técnica de eletroquimioluminescência também não foi satisfatória, com resultado muito abaixo do padrão testado. A literatura cita o uso de kits de ensaios imunoradiométricos (FROLIK et al., 2003) e diferentes PTH ELISA Kit (DANG et al., 2017). No entanto, as concentrações testadas nestes artigos são na ordem de $\mu\text{g/mL}$ para o ELISA. Já os ensaios que detectaram na ordem de ng/mL foram os imunoradiométricos, que utilizam materiais radioativos e possuem um alto custo (GRANGE; THOMPSON; LAMBERT, 2014).

Além da quantificação da liberação do PTH, muitos outros testes ainda necessitam ser realizados antes da possível confirmação deste biomaterial como possível aplicação no mercado.

6. CONCLUSÕES

- As superfícies de Ti recobertas com DHP/HAp mostraram uma ótima atividade osteogênica, pois aumentaram a viabilidade celular ao 7º, 14º e 21º dia de cultura, o conteúdo proteico total ao 7º, 14º e 21º dia, a concentração de colágeno ao 14º e 21º dia, a atividade da fosfatase alcalina ao 14º dia e formação de nódulos mineralizados ao 14º e 21º dia de cultivo das culturas primárias de osteoblastos quando comparados ao Ti limpo.
- As superfícies de Ti recobertas com OPA/HAp mostraram não possuir atividade osteogênica apesar do aumento da viabilidade celular ao 7º e 14º dia de cultivo. Pois diminuíram o conteúdo total de proteínas ao 7º, 14º e 21º dia, a concentração de colágeno ao 7º, 14º e 21º dia, a atividade da ALP ao 21º dia, e a formação da matriz mineralizada ao 14º e 21º dia de cultivo quando comparadas ao Ti limpo.
- O revestimento de OPA/HAp possui uma concentração de Ca^{2+} 1,88 vezes superior à cobertura de DHP/HAp.
- As superfícies de Ti recobertas com DHP/Ca, OPA/Ca e DPPC/Ca sem posterior deposição de HAp mostraram não possuir atividade osteogênica, e inibiram tanto a proliferação, quanto a mineralização dos osteoblastos (DHP/Ca e DPPC/Ca) quando comparados ao Ti limpo.
- Concentrações de PTH 1-34 mostraram ser tóxicas para as culturas primárias de osteoblastos em concentrações acima de 100 ng/mL.
- A massa de PTH 1-34 adsorvida no filme LB de DPPC é 2,5 vezes maior do que no filme LB de DHP.
- As superfícies de Ti recobertas com Ti/DHP+PTH e Ti/DPPC+PTH mostraram não possuir atividade osteogênica, e inibiram tanto a proliferação, quanto a mineralização dos osteoblastos quando comparados ao Ti limpo.

- As superfícies de Ti recobertas com Ti HAp/PTH S mostraram possuir ótima atividade osteogênica quando comparado ao Ti. Mas não teve diferença significativa quando comparado à cobertura de Ti DHP/HAp.
- As superfícies de Ti recobertas com Ti HAp/PTH G mostraram possuir ótima atividade osteogênica quando comparado ao Ti limpo. E a viabilidade celular e formação da matriz mineralizada, embora seja uma diferença sutil, mostrou ser ligeiramente superior à cobertura de Ti DHP/HAp.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical Chemistry of Surfaces**. 6th. ed. [s.l.] Wiley-Interscience, 1997.

ADVINCULA, M. et al. Surface modification of surface sol-gel derived titanium oxide films by self-assembled monolayers (SAMs) and non-specific protein adsorption studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 42, n. 1, p. 29–43, 2005.

AHERWAR, A.; K SINGH, A.; PATNAIK, A. Current and future biocompatibility aspects of biomaterials for hip prosthesis. **AIMS Bioengineering**, v. 3, n. 1, p. 23–43, 2015.

AHMAD, M. et al. Differential response of human osteoblast-like cells to commercially pure (cp) titanium grades 1 and 4. **Journal of biomedical materials research**, v. 46, n. 1, p. 121–31, jul. 1999.

AMERI, M.; DADDONA, P. E.; MAA, Y. F. Demonstrated solid-state stability of parathyroid hormone PTH(1-34) coated on a novel transdermal microprojection delivery system. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 11, p. 2454–2463, 2009.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667–681, 2000.

BARRÈRE, F. et al. In vitro and in vivo degradation of biomimetic octacalcium phosphate and carbonate apatite coatings on titanium implants. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 64, n. 2, p. 378–87, 2003.

BELCHETZ, P. et al. Hypophyseal responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalamic gonadotropin-releasing hormone. **Science**, v. 202, n. 4368, p. 631–633, 10 nov. 1978.

BELLIDO, T. et al. Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts: A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 50, p. 50259–50272, 2003.

BERTAZZO, S. et al. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 2, p. 177–184, 2010.

BHOLA, R. et al. Corrosion in titanium dental implants/prostheses - A review. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 25, n. 1, p. 34–46, 2011.

BIGI, A. et al. In vitro culture of mesenchymal cells onto nanocrystalline hydroxyapatite-coated Ti13Nb13Zr alloy. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 82A, n. 1, p. 213–221, jul. 2007.

BLODGETT, K. B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 57, n. 6, p. 1007–1022, jun. 1935.

BONNELYE, E.; AUBIN, J. E. Estrogen Receptor-Related Receptor α : A Mediator of Estrogen Response in Bone. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 5, p. 3115–3121, maio 2005.

BOSETTI, M. et al. Cell behaviour on phospholipids-coated surfaces. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 4, p. 611–617, 2007.

- BOSKEY, A. L. Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 157, p. 225–57, jun. 1981.
- BOSKEY, A. L. Mineralization of bones and teeth. **Elements**, v. 3, n. 6, p. 385–391, 2007.
- BOSKEY, A. L. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. **BoneKEY reports**, v. 2, n. July, p. 447, 2013.
- BOSKEY, A.; PLESHKO CAMACHO, N. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 28, n. 15, p. 2465–2478, 2007.
- BOYAN, B. D. et al. Role of lipids in calcification of cartilage. **The Anatomical Record**, v. 224, n. 2, p. 211–219, jun. 1989.
- BRÅNEMARK, P. I. Osseointegration and its experimental background. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 50, n. 3, p. 399–410, set. 1983.
- BRIE, I.-C. et al. Comparative in vitro study regarding the biocompatibility of titanium-base composites infiltrated with hydroxyapatite or silicatitanate. **Journal of biological engineering**, v. 8, n. 1, p. 14, 2014.
- BUSER, D. et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 25, n. 7, p. 889–902, jul. 1991.
- CAMOLEZI, F. L. et al. Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: A tool for biomineralization study. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, p. 1091–1101, 2002.
- CARBONE, E. J. et al. Osteotropic nanoscale drug delivery systems based on small molecule bone-targeting moieties. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 37–47, 2017.
- CASELI, L. et al. Using phospholipid Langmuir and Langmuir-Blodgett films as matrix for urease immobilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, n. 1, p. 100–108, 2008.
- CASTILLO-SANTAELLA, T. DEL et al. Specific ion effects in cholesterol monolayers. **Materials**, v. 9, n. 5, 2016.
- CHAPMAN, D. L. LI. *A contribution to the theory of electrocapillarity*. **Philosophical Magazine Series 6**, v. 25, n. 148, p. 475–481, 1913.
- CIANCAGLINI, P. et al. Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 5, p. 603–610, 2006.
- COHEN, L. et al. Comparison of structural, architectural and mechanical aspects of cellular and acellular bone in two teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, p. 1983–1993, 2012.
- COLLIER, J. H.; MESSERSMITH, P. B. Phospholipid Strategies in Biomineralization and Biomaterials Research. **Annual Review of Materials Research**, v. 31, n. 1, p. 237–263, ago. 2001.

- COZZOLINO, M. et al. Management of osteogenesis imperfecta type I in pregnancy; a review of literature applied to clinical practice. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, p. 1–7, 2016.
- CROSS, L. M. et al. Nanoengineered biomaterials for repair and regeneration of orthopedic tissue interfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 42, p. 2–17, 2016.
- CRUZ, M. A. E. et al. Calcium carbonate hybrid coating promotes the formation of biomimetic hydroxyapatite on titanium surfaces. **Applied Surface Science**, v. 370, p. 459–468, 2016.
- CÜNEYT TAS, A. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. **Biomaterials**, v. 21, n. 14, p. 1429–1438, 2000.
- DANG, M. et al. Local pulsatile PTH delivery regenerates bone defects via enhanced bone remodeling in a cell-free scaffold. **Biomaterials**, v. 114, p. 1–9, 2017.
- DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. **Interfacial phenomena**. 2nd ed. ed. [s.l.: s.n.].
- DE FARIA, A. N. et al. Estrogen and phenol red free medium for osteoblast culture: study of the mineralization ability. **Cytotechnology**, p. 1623–1632, 2015.
- DE FARIA, A. N. et al. Estrogen and phenol red free medium for osteoblast culture: study of the mineralization ability. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1623–1632, 30 ago. 2016.
- DE GROOT, K. et al. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. **Journal of biomedical materials research**, v. 21, n. 12, p. 1375–81, 1987.
- DE SOUZA, I. D. et al. Formation of carbonated hydroxyapatite films on metallic surfaces using dihexadecyl phosphate-LB film as template. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 118, p. 31–40, 2014.
- DENNISON, S. R.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. A Langmuir approach using on monolayer interactions to investigate surface active peptides. **Protein and peptide letters**, v. 17, n. 11, p. 1363–1375, 2010.
- DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 4, p. 1061–1095, 14 fev. 2007.
- DOROZHKIN, S. V. **Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine** Materials, 2009.
- FENG, B. et al. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. **Biomaterials**, v. 24, n. 25, p. 4663–4670, 2003.
- FENG, B. et al. Characterization of titanium surfaces with calcium and phosphate and osteoblast adhesion. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3421–3428, 2004.
- FERREIRA, J. V. N. et al. Mechanism of Action of Thymol on Cell Membranes Investigated through Lipid Langmuir Monolayers at the Air–Water Interface and Molecular Simulation. **Langmuir**, v. 32, n. 13, p. 3234–3241, 5 abr. 2016.
- FITZPATRICK, L. A.; BILEZIKIAN, J. P. **Parathyroid Hormone: Structure, Function and Dynamic Actions**. [s.l.] ACADEMIC PRESS, 2006.

- FROLIK, C. A. et al. Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure. **Bone**, v. 33, n. 3, p. 372–379, 2003.
- GARDON, M.; GUILMANY, J. M. Milestones in functional titanium dioxide thermal spray coatings: A review. **Journal of Thermal Spray Technology**, v. 23, n. 4, p. 577–595, 2014.
- GEETHA, M. et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 397–425, 2009.
- GENTLEMAN, E.; POLAK, J. M. Historic and current strategies in bone tissue engineering: Do we have a hope in Hench? **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1029–1035, 22 nov. 2006.
- GENTLEMAN, M. M.; AND GENTLEMAN, E. The role of surface free energy in osteoblast–biomaterial interactions. **International Materials Reviews**, v. 59, n. 8, p. 417–429, 2014.
- GOLUB, E. E. Role of matrix vesicles in biomineralization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1790, n. 12, p. 1592–1598, dez. 2009.
- GOLUB, E. E.; BOESZE-BATTAGLIA, K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. **Current Opinion in Orthopaedics**, v. 18, n. 5, p. 444–448, 2007.
- GOLUB, M. et al. X-ray and neutron investigation of self-assembled lipid layer on a titanium surface. **Biointerphases**, v. 8, n. 21, p. 2–11, 2013.
- GOMES, L. C. et al. Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha (Synthesis and characterization of calcium. v. 58, p. 448–452, 2012.
- GOUY, G. Constitution of the electric charge at the surface of an electrolyte. **J. Phys.**, n. 9, p. 457–467, 1910.
- GRANGE, R. D.; THOMPSON, J. P.; LAMBERT, D. G. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. **British Journal of Anaesthesia**, v. 112, n. 2, p. 213–216, 1 fev. 2014.
- GREGORY, C. A. et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 77–84, 2004.
- GRIZON, F. et al. Enhanced bone integration of implants with increased surface roughness: A long term study in the sheep. **Journal of Dentistry**, v. 30, n. 5–6, p. 195–203, 2002.
- GUO, C. Y.; MATINLINNA, J. P.; TANG, A. T. H. Effects of surface charges on dental implants: Past, present, and future. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, 2012.
- HABIBOVIC, P.; BARRERE, F. Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 85, n. 3, p. 517–522, 2002.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422–427, 1972.
- HAYAKAWA, T. Biochemical surface modifications to titanium implants using the tresyl chlorideactivated method. **Dental Materials Journal**, v. 34, n. 6, p. 725–739, 2015.

- HODSMAN, A. B. et al. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: A review of the evidence and suggested guidelines for its use. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 5, p. 688–703, 2005.
- HORWITZ, M. J. et al. A 7-day continuous infusion of PTH or PTHrP suppresses bone formation and uncouples bone turnover. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 9, p. 2287–2297, set. 2011.
- HOU, N. et al. Novel Development of Biocompatible Coatings for Bone Implants. **Coatings**, v. 5, n. 4, p. 737–757, 2015.
- HOYLAERTS, M. F. et al. Functional Significance of Calcium Binding to Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0119874, 2015.
- HUANG, H.-M. et al. Biological surface modification of titanium surfaces using glow discharge plasma. **Medical & biological engineering & computing**, v. 49, n. 6, p. 701–6, 2011.
- HWANG, S. Y.; PUTNEY, J. W. Calcium signaling in osteoclasts. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 979–983, 2011.
- IIDA-KLEIN, A. et al. Short-term continuous infusion of human parathyroid hormone 1-34 fragment is catabolic with decreased trabecular connectivity density accompanied by hypercalcemia in C57BL/J6 mice. **Journal of Endocrinology**, v. 186, n. 3, p. 549–557, 2005.
- ISHIZUYA, T. et al. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 12, p. 2961–2970, 1997.
- JANUŠ, M. et al. Surface Modification of Titanium by Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition (PACVD) Methods. **Solid State Phenomena**, v. 199, p. 561–566, 2013.
- JILKA, R. L. et al. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 4, p. 439–446, 1999.
- JILKA, R. L. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. **Bone**, v. 40, n. 6, p. 1434–1446, 2007.
- JILKA, R. L. et al. Intermittent PTH stimulates periosteal bone formation by actions on post-mitotic preosteoblasts. **Bone**, v. 44, n. 2, p. 275–286, 2009.
- JONES, C. W. et al. Confocal laser scanning microscopy in orthopaedic research. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1–71, 2005.
- KAMO, K. et al. Intermittent weekly administration of human parathyroid hormone (1-34) improves bone-hydroxyapatite block bonding in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 28, n. 6, p. 634–640, 2010.
- KANO, J. et al. Cross talk of dual-signal transduction systems in the regulation of DNA synthesis by parathyroid hormone in osteoblastic osteosarcoma cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 8, n. 3, p. 323–329, 3 dez. 2009.
- KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518–522, ago. 2000.

KAZARIAN, S. G.; CHAN, K. L. A. ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. **The Analyst**, v. 138, n. 7, p. 1940, 2013.

KIRMANIDOU, Y. et al. New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

KOKUBO, T. et al. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 24, n. 6, p. 721–734, 1990.

KOKUBO, T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. **Acta Materialia**, v. 46, n. 7, p. 2519–2527, 1998.

KOKUBO, T.; YAMAGUCHI, S. Novel bioactive materials developed by simulated body fluid evaluation: Surface-modified Ti metal and its alloys. **Acta Biomaterialia**, v. 44, p. 16–30, out. 2016.

KULKARNI, M. et al. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. **Nanomedicine**, p. 111–136, 2014.

LANGMUIR, I. THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. v. 39, p. 1848–1906, 1917.

LE GUÉHENNEC, L. et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**, v. 23, n. 7, p. 844–854, 2007.

LEE, K.-W. et al. Surface characteristics and biological studies of hydroxyapatite coating by a new method. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 98, n. 2, p. 395–407, 2011.

LEONE, F. A.; CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M. Effect of calcium ions on rat osseous plate alkaline phosphatase activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 68, n. 2, p. 123–127, 1997.

LEONE, F. DE A.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Rat Osseous Plate Alkaline Phosphatase: A Search For Its Role In Biomineralization. **TRENDS IN COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY.**, v. 3, p. 57–73, 1997.

LI, T. et al. Effect of osteoblast activity of porous titanium with HA-coating by adding human-like collagen. **Materials Research Innovations**, v. 18, n. sup4, p. S4-952-S4-957, 5 jul. 2014.

LIAN, J. B.; STEIN, G. S. **The Cells of Bone**. [s.l.] ACADEMIC PRESS, 2006.

LIANG, Y. et al. Zinc ion implantation-deposition technique improves the osteoblast biocompatibility of titanium surfaces. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 6, p. 4225–4231, 2015.

LIU, H.; WEBSTER, T. J. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials**, v. 28, n. 2, p. 354–369, 2007.

LIU, S. et al. The effect of bovine parathyroid hormone withdrawal on MC3T3-E1 cell proliferation and phosphorus metabolism. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015.

- LIU, Y. et al. Evaluation of the attachment, proliferation, and differentiation of osteoblast on a calcium carbonate coating on titanium surface. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 5, p. 1055–1061, 2011.
- LOSSDÖRFER, S. et al. Maturation-state dependent response of human periodontal ligament cells to an intermittent parathyroid hormone exposure in vitro. **Journal of Periodontal Research**, v. 41, n. 1, p. 62–72, 2006.
- MA, J. et al. Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium. **Nanotechnology**, v. 14, n. 6, p. 619–623, 2003.
- MACDONALD, B. R.; GALLAGHER, J. A.; RUSSELL, R. G. G. Parathyroid Hormone Stimulates the Proliferation of Cells Derived from Human Bone. **Endocrinology**, v. 118, n. 6, p. 2445–2449, jun. 1986.
- MAINIER, F. B. et al. Evaluation of titanium in hydrochloric acid solutions containing corrosion inhibitors. **IOSR Journal of Mechanical and Civil Engineering (IOSR-JMCE)**, v. 10, n. 1, p. 66–69, 2013.
- MAJESKA, R. J.; RODAN, G. A. Alkaline phosphatase inhibition by parathyroid hormone and isoproterenol in a clonal rat osteosarcoma cell line. Possible mediation by cyclic AMP. **Calcified tissue international**, v. 34, n. 1, p. 59–66, jan. 1982.
- MANDRACCI, P. et al. Surface Treatments and Functional Coatings for Biocompatibility Improvement and Bacterial Adhesion Reduction in Dental Implantology. **Coatings**, v. 6, n. 1, p. 7, 2016.
- MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A. H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell and tissue research**, v. 254, n. 2, p. 317–30, 1988.
- MAO, Y. Research Progress on the Biochemical Modification of Titanium Implant Surface. **Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 11, p. 742–747, 2014.
- MARKOVIC, M.; FOWLER, B. O.; TUNG, M. S. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 109, n. 6, p. 553, nov. 2004.
- MARTÍN-MOLINA, A.; RODRÍGUEZ-BEAS, C.; FARAUDO, J. Effect of calcium and magnesium on phosphatidylserine membranes: Experiments and all-atomic simulations. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 9, p. 2095–2103, 2012.
- MIHOV, D.; KATERSKA, B. Some Biocompatible Materials Used in Medical Practice. **Trakia Journal of Sciences**, v. 8, p. 119–125, 2010.
- MILLÁN, J. L. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. **Calcified Tissue International**, v. 93, n. 4, p. 299–306, 2013.
- MOHAJERI, A.; HAGHSHENAS, F. Global reactivity and site selectivity of (TiO₂)_n nanoclusters (n = 5–10) toward hydrogen peroxide. **Materials Chemistry and Physics**, v. 183, p. 326–333, 2016.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p.

55–63, 1983.

NAYAB, S. N.; JONES, F. H.; OLSEN, I. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium. **Biomaterials**, v. 26, n. 23, p. 4717–4727, 2005.

NEER, R. M. et al. Effect of Parathyroid Hormone (1-34) on Fractures and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 19, p. 1434–1441, 10 maio 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. [s.l: s.n.].

NOVAES, A. B. et al. Influence of implant surfaces on osseointegration. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 6, p. 471–481, 2010.

OFFERMANN, V. et al. Bone regenerating effect of surface-functionalized titanium implants with sustained-release characteristics of strontium in ovariectomized rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2431–2442, 2016.

OLSZTA, M. J. et al. Bone structure and formation: A new perspective. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 58, n. 3–5, p. 77–116, 2007.

ONG, J. L. et al. The characterization and development of bioactive hydroxyapatite coatings. **Jom**, v. 58, n. 7, p. 67–69, 2006.

OTSUKA, Y.; KAWAGUCHI, H.; MUTOH, Y. Cyclic delamination behavior of plasma-sprayed hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V substrates in simulated body fluid. **Materials Science and Engineering C**, v. 67, p. 533–541, 2016.

OYANE, A. et al. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. **J Biomed Mater Res**, v. 65, p. 188–195, 2003.

OZAWA, S.; KASUGAI, S. Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramics, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture. **Biomaterials**, v. 17, n. 1, p. 23–29, 1996.

PARTRIDGE, N. C. et al. Inhibitory effects of parathyroid hormone on growth of osteogenic sarcoma cells. **Calcified tissue international**, v. 37, n. 5, p. 519–25, set. 1985.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Allosteric modulation by ATP, calcium and magnesium ions of rat osseous plate alkaline phosphatase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, v. 1202, n. 1, p. 22–28, 1993.

POTTS, J. T. Parathyroid hormone: Past and present. **Journal of Endocrinology**, v. 187, n. 3, p. 311–325, 2005.

PUCKETT, S. D. et al. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 706–713, 2010.

QIN, L. et al. Parathyroid hormone uses multiple mechanisms to arrest the cell cycle progression of osteoblastic cells from G1 to S phase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 4, p. 3104–3111, 2005.

QUATTROCCHI, E.; KOURLAS, H. Teriparatide: A review. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 841–854, 2004.

- RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 2010.
- RAGHAVENDRAN, H. R. B. et al. A Comparative Study on In Vitro Osteogenic Priming Potential of Electron Spun Scaffold PLLA/HA/Col, PLLA/HA, and PLLA/Col for Tissue Engineering Application. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104389, 20 ago. 2014.
- RAMIRES, P. A. et al. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. **Biomaterials**, v. 22, n. 12, p. 1467–1474, 2001.
- RAMOS, A. P.; ESPIMPOLO, D. M.; ZANIQUELLI, M. E. D. Influence of the type of phospholipid head and of the conformation of the polyelectrolyte on the growth of calcium carbonate thin films on LB/LbL matrices. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 178–185, 2012.
- REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 225–229, 1996.
- REDEY, S. A. et al. Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy. **Journal of biomedical materials research**, v. 50, n. 3, p. 353–64, 5 jun. 2000.
- ROBERTS, S. J. et al. Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoethanolamine and phosphocholine phosphatase activities. **The Biochemical journal**, v. 382, n. Pt 1, p. 59–65, 2004.
- RØKKUM, M.; REIGSTAD, A.; JOHANSSON, C. B. HA particles can be released from well-fixed HA-coated stems: histopathology of biopsies from 20 hips 2-8 years after implantation. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 73, n. 3, p. 298–306, 2002.
- ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Development of the osteoblast phenotype of serial cell subcultures from human bone marrow. **Brazilian Dental Journal**, v. 16, n. 3, p. 225–230, 2005.
- ROUAHI, M. et al. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials. **Biomaterials**, v. 27, p. 2829–2844, 2006.
- RUIZ, G. C. **Formação biomimética de fosfatos de cálcio sobre superfície de titânio utilizando-se filmes de Langmuir-Blodgett: influência da incorporação de colágeno nas matrizes**. [s.l.] Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, 2015.
- SAUERBREY, G. Verwendung Von Schwingquarzen Zur Wagung Dunner Schichten Und Zur Mikrowagung. **Zeitschrift für Physik**, v. 155, n. 2, p. 206–222, abr. 1959.
- SAY, J. C. et al. Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1074, n. 2, p. 256–62, 8 jul. 1991.
- SCHAKENRAAD, J. M. et al. Thermodynamic aspects of cell spreading on solid substrata. **Cell Biophysics**, v. 13, n. 1, p. 75–91, ago. 1988.
- SCHMIDT, R. C.; HEALY, K. E. Controlling biological interfaces on the nanometer length scale. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 90A, n. 4, p. 1252–1261, 15 set. 2009.

- SCUTT, A. et al. Time-dependent effects of parathyroid hormone and prostaglandin E2 on DNA synthesis by periosteal cells from embryonic chick calvaria. **Calcified tissue international**, v. 55, n. 3, p. 208–15, set. 1994.
- SHI, Z. et al. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 338–345, 2009.
- SIKON, A.; BATUR, P. Profile of teriparatide in the management of postmenopausal osteoporosis. **International Journal of Women's Health**, v. 2, n. 1, p. 37–44, 2010.
- SIMÃO, A. M. S. et al. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: A useful source of alkaline phosphatase. **Cell Biology International**, v. 31, p. 1405–1413, 2007.
- SIMÃO, A. M. S. et al. Proteoliposomes as matrix vesicles' biomimetics to study the initiation of skeletal mineralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43 VN-r, n. 3, p. 234–241, 2010.
- SINGH, G.; SINGH, S.; PRAKASH, S. Characterization and Corrosion Behavior of Plasma Sprayed Pure and Reinforced HA Coatings in Simulated Body Fluid. **Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering**, v. 10, n. 9, p. 765–775, 2011.
- SIQUEIRA, J. R. et al. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 6, p. 1254–1263, 2010.
- SLATOPOLSKY, E.; DUSSO, A.; BROWN, A. J. The role of phosphorus in the development of secondary hyperparathyroidism and parathyroid cell proliferation in chronic renal failure. **The American journal of the medical sciences**, v. 317, n. 6, p. 370–6, jun. 1999.
- SMEETS, R. et al. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.
- STERN, O. Zur Theorie der Elektrolytischen Doppelschicht. **Zeitschrift fur Elektrochemie**, v. 30, p. 508–516, 1924.
- STOICA-GUZUN, A. et al. Ultrasound influence upon calcium carbonate precipitation on bacterial cellulose membranes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 4, p. 909–915, 2012.
- ŚWIECZKO – ŻUREK, B.; BARTMAŃSKI, M. Investigations of Titanium Implants Covered with Hydroxyapatite Layer. **Advances in Materials Science**, v. 16, n. 2, 2016.
- TAKADAMA, H. et al. TEM-EDX study of mechanism of bonelike apatite formation on bioactive titanium metal in simulated body fluid. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 57, n. 3, p. 441–448, 2001.
- TORRANO, A. A. et al. Probing the interaction of oppositely charged gold nanoparticles with DPPG and DPPC Langmuir monolayers as cell membrane models. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 120–126, 2013.
- VAN MEER, G.; DE KROON, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. **Journal of cell science**, v. 124, n. Pt 1, p. 5–8, 2011.
- VATER, C.; KASTEN, P.; STIEHLER, M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 2, p. 463–477, 2011.

VERRON, E. et al. Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. **Drug discovery today**, v. 15, n. 13–14, p. 547–552, 2010.

WANG, Y. Bioadaptability: an Innovative Concept for Biomaterials. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 32, n. 9, p. 1–9, 2016.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, 2008.

WU, L. et al. Effect of anodization time on morphology and electrochemical impedance of anodic oxide films on titanium alloy in tartrate solution. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 9, p. 5012–5024, 2014.

WUTHIER, R. E.; LIPSCOMB, G. F. Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 16, p. 2812–902, 1 jun. 2011.

XUE, Z. H. et al. Effect of Langmuir monolayer of bovine serum albumin protein on the morphology of calcium carbonate. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 6, p. 1998–2002, 2009.

YAMAGUCHI, A.; KOMORI, T.; SUDA, T. Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 4, p. 393–411, ago. 2000.

YANG, C. JUAN et al. Modification of wettability property of titanium by laser texturing. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, p. 1–8, 2016.

YANG, W. et al. Surface engineering of titanium alloy substrates with multilayered biomimetic hierarchical films to regulate the growth behaviors of osteoblasts. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 10, p. 4525–4536, 2014.

YARLAGADDA, P. K. D. V et al. Nanoscale texture on glass and Titanium substrates by physical vapor deposition process. **Procedia Engineering**, v. 97, p. 1506–1511, 2014.

YOUNG, M. F. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 14 Suppl 3, p. S35–42, 2003.

ZANCANELA, D. C. et al. Multi and single walled carbon nanotubes: effects on cell responses and biomineralization of osteoblasts cultures. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 3, p. 62, 22 mar. 2016.

ZAVAGLIA, C. A. C.; PRADO DA SILVA, M. H. Feature Article: Biomaterials. **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**, v. 10, p. 1–5, 2016.

ZAYZAFOON, M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, n. 1, p. 56–70, 2006.

ZHANG, J. et al. Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid. **Biomaterials**, v. 26, n. 16, p. 3353–3361, 2005.

7. ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 011/2014-1, sobre o projeto intitulado “*Avaliação da atividade osteogênica de superfícies de titânio revestidas com fosfato de cálcio em camadas de lipídios*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Pietro Ciancaglini** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 28 de julho de 2014.

We certify that the protocol nº 011/2014-1, entitled “*Evaluation of osteogenic activity of titanium surfaces coated with calcium phosphate on lipids layers*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 07/28/2014.

Ribeirão Preto, 28 de julho de 2014.

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética
no Uso de Animais. em exercício

Cite this: RSC Adv., 2016, 6, 90509

Bio-inspired synthesis of hybrid tube-like structures based on CaCO_3 and type I-collagen

Received 26th July 2016
Accepted 8th September 2016 DOI: 10.1039/c6ra18984a www.rsc.org/advances

C. B. Tovani,¹ D. C. Zancanela,^a A. N. Faria,^{a2} P. Ciancaglini^a and A. P. Ramos^{*a}

Although the exciting features exhibited by tube-like structures make them potential candidates for biomedical applications, few studies have dealt with the combination of tubular geometries and the biological responses of biominerals. This study reports on the synthesis of tube-like hybrid structures based on calcium carbonate, a biocompatible mineral, and collagen, the most abundant protein in bone tissue. A biomimetic model aided the synthesis of uniform tubular structures with controlled shape and diameter in the range of 100, 200, and 400 nm. Immersion of the particles in simulated body fluid (SBF) at 37 °C for 48 h allowed us to evaluate the bioactivity of the structures. Infrared spectroscopy revealed that biological apatite emerged in the material, confirming its bioactivity. Zeta-potential measurements attested to the high colloidal stability of the nanoparticles in the presence and absence of collagen. Confocal laser microscopy images confirmed that osteoblastic cells cultured in the presence of collagen-modified CaCO_3 tube-like nanoparticles proliferated. The 100 nm particles presented special behavior—they adsorbed a larger amount of collagen due to their higher surface area.

¹ Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14040-901, SP, Brazil. E-mail: anapr@usp.br

² Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Multi and single walled carbon nanotubes: effects on cell responses and biomineralization of osteoblasts cultures

Daniela C. Zancanela¹ · Amanda N. de Faria^{1,2} · Ana Maria S. Simão¹ ·

Rogéria R. Gonçalves¹ · Ana Paula Ramos¹ · Pietro Ciancaglini¹

Received: 29 August 2015/Accepted: 12 January 2016/Published online: 22 January 2016
Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract The use of carbon nanotubes (CNTs) on the development of biomaterials has been motivated by their excellent mechanical properties that could improve synthetic bone materials. However, the toxicity of CNTs on the tissue/implant interface and their influence on the biomineralization process have some contradictions. We investigated the influence of CNTs on osteoblasts plated on titanium (Ti) discs or plastic surfaces. We evaluated osteoblasts viability, alkaline phosphatase (ALP) activity, and mineralized matrix formation in the different phases of osteoblasts growth in the presence of single-walled CNTs (SWCNTs) and multi-walled CNTs (MWCNTs). An increase in osteoblasts viability was observed at the 21st day for both CNTs on plastic surface, while viability increased for MWCNTs at the 7th and 14th days and at the 7th day for SWCNTs on Ti discs compared to control. ALP activity increased at the 14th and 21st days for MWCNTs on plastic surfaces. For cells incubated with SWCNTs, an increase in ALP activity at the 7th day for plastic surface and at the 14th day for both materials (plastic and Ti) was observed. The mineralized matrix formation increased at the 21st day on plastic surface with SWCNTs, and at the 14th and 21st days for both CNTs on

Ti discs. In conclusion, both SWCNTs and MWCNTs are not toxic to osteoblasts at concentrations up to 5.9×10^{-5} and 1.39×10^{-2} mg/mL, respectively, either in Ti discs or plastic surfaces. In the long term, the cells grown in contact with both CNTs and Ti presented better results regarding bone-like nodules formation.

1 Introduction

Nanotechnology is broadly explored to the design of new biomaterials, especially those applied in regenerative medicine like the bone substituting implants [1]. The literature describes the use of carbon nanotubes (CNTs) on the development of biomaterials due to their excellent mechanical properties like stiffness, high flexibility, high Young's modulus [2, 3], low density, high surface area, and elevated mechanical integrity. These organic nanoparticles can reinforce ceramics [3] and improve the mechanical properties of synthetic bone materials. The dimension of CNTs mimics the structure of the triple-helix collagen fibrils present in the extracellular matrix of osteoblasts [1, 4], conferring the ability to act as scaffolds to guide bone

Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil
tissue regeneration [5, 6].

The single-walled CNTs (SWCNTs) consist of a single rolled-up graphene sheet, composed exclusively by carbon atoms organized in a structure with the same order of magnitude of DNA [7, 8]. The multi-walled CNTs (MWCNTs) are composed of concentric cylinders consisting of several layers of graphene sheets [9], placed

✉ Daniela C. Zancanela danielaquimica@gmail.com

Pietro Ciancaglini pietro@ffclrp.usp.br

¹ Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil

² Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de

Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsusc

Calcium carbonate hybrid coating promotes the formation of biomimetic hydroxyapatite on titanium surfaces

Marcos Antônio E. Cruz^a, Gilia C.M. Ruiz^a, Amanda N. Faria^{a,b}, Daniela C. Zancanela^a,Lourivaldo S. Pereira^a, Pietro Ciancaglini^a, Ana P. Ramos^{a,*}

^aDepartamento de Química-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14040-901, SP, Brazil ^bDepartamento de Bioquímica e Imunologia-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

article info

Article history:

Received 24 June 2015

Received in revised form 2 December 2015

Accepted 4 December 2015 Available online

21 February 2016

Keywords: Calcium carbonate hydroxyapatite Langmuir–Blodgett films Titanium Bioactive surfaces

abstract

1. Introduction

The progressive interest in titanium (Ti) and its alloys for biomedical applications stem from their mechanical strength and superior corrosion resistance, acting as a key material in orthopedic, dental implant, hip-joint replacement devices, and heart-valves [1]. The metallic Ti contains an oxide layer on its surface that inhibits the initial attachment of osteoblasts being a reason for implant failure [2]. In this case, a thin fibrous layer that isolates the metallic surface from the host-bone can be formed. Modifying Ti-surfaces may improve the contact with the live tissue for bone-substitution applications [3]. These modifications aim to improve surface properties such as topography, wettability, charge, and chemical properties. These factors should be optimized to promote a better response in the cell–biomaterial interface, managed by protein adsorption, cell adhesion, and specific interactions. In special, nanopatterned surfaces increase the interfacial area and improve the adhesion of bioactive molecules like proteins,

CaCO₃ particles dispersed in liquid media have proven to be good inducers of hydroxyapatite (HAp) growth. However, the use of CaCO₃ deposited as thin films for this purpose is unknown. Here, we report the growth of CaCO₃ continuous films on Langmuir–Blodgett (LB) modified titanium surfaces and its use as HAp growth inducer. The Ti surfaces were modified with two, four, and six layers of dihexadecylphosphate (DHP)-LB films containing Ca²⁺, exposed to CO₂ (g) for 12 h. The modified surfaces

2

were immersed in simulated body fluid (SBF) at 37 °C for 36 h and submitted to bioactivity studies. This procedure originates bioactive coatings composed by non-stoichiometric HAp as evidenced by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-ray Diffraction (XRD), and X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). The presence of the CaCO₃ films as pre-coating diminished the time necessary to growth continuous and homogeneous HAp films using a biomimetic approach. The surface properties of the films regarding their roughness, composition, charge, wettability, and surface free energy (γ_s) were accessed. The presence of HAp increased the wettability and, of the surfaces. The coatings are not toxic for osteoblasts as observed for cell viability assays obtained after 7 and 14 days of culture. Moreover, the CaCO₃ thin films promote the recovery of the osteoblasts viability more than the Ti surfaces themselves.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.12.250> 0169-4332/© 2016

Elsevier B.V. All rights reserved.

including extracellular matrix and cytoskeleton proteins [4]. Moreover, the contact between the implant and the body fluid can be enhanced by increasing the wettability of the surfaces. The charge can be modulated in order to tailor the nonspecific interactions between cells and the biomaterials via ionic, electrostatic, and polar components of the surface free energy [5]. A useful approach to change the surface chemistry and improve reactivity is to obtain bioactive surfaces that mimic bone structure and composition; i.e., to achieve surfaces where calcium phosphates and carbonates can grow, thereby enhancing surface biocompatibility, osteoinduction, and osteointegration properties.

Hydroxyapatite (HAp) is the most used biomineral in order to produce bone-like coatings because its main inorganic compound is found in several tissues. The biomimetic growth of HAp on metallic surfaces is commonly made by the exposure to simulated body fluid (SBF) solutions [6,7]. In this methodology, the apatite-like coating is attained by placing the substrates into a solution that simulates the pH and ionic composition of the human plasma, at 37 °C. The exposure to a SBF solution is also a procedure used to confirm the bioactivity of the material [8]. Besides calcium phosphates, calcium carbonate (CaCO₃), which is one of the most abundant biomineral in nature, is also an important biomaterial which has been widely used in bone surgery

* Corresponding author.

E-mail address: anapr@ffclrp.usp.br (A.P. Ramos).

Graphene oxide and titanium: synergistic effects on the biomineralization ability of osteoblast cultures

Daniela C. Zancanela¹ · Ana Maria S. Simão¹ · Camila G. Francisco¹ ·

Amanda N. de Faria^{1,2} · Ana Paula Ramos¹ · Rogéria R. Gonçalves¹ ·

Elaine Y. Matsubara¹ · José Maurício Rosolen¹ · Pietro Cincaglini¹

Received: 3 November 2015/Accepted: 25 January 2016/Published online: 17 February 2016
Springer Science+Business Media New York 2016

1 Introduction

Abstract Graphene oxide (GO) has attracted remarkable attention in recent years due to properties such as extremely large surface area, biocompatibility, biostability, and easy chemical functionalization. Osteoblasts underlie the deposition of hydroxyapatite crystals in the bone protein matrix during biomineralization; hydroxyapatite deposition involves extracellular matrix vesicles that are rich in alkaline phosphatase (ALP). Here, we have investigated how GO affects osteoblast viability, ALP activity, and mineralized matrix formation in osteoblast cultures in three different phases of cell growth, in the presence and in the absence of titanium (Ti). Scanning electron microscopy (SEM), Raman spectra, and energy dispersive spectroscopy aided GO characterization. The presence of GO increased the viability of osteoblast cells grown on a plastic surface. However, osteoblast viability on Ti discs was lower in the presence than in the absence of GO. ALP activity emerged at 14 days for the cell culture incubated with GO. The total protein concentration also increased at 21 days on both the Ti discs and plastic surface.

Osteoblasts grown on Ti discs had increased mineralized matrix formation in the presence of GO as compared to the cells grown in the absence of GO. SEM images of the cell cultures on plastic surfaces in the presence of GO suggested delayed mineralized matrix formation. In conclusion, applications requiring the presence of Ti, such as prostheses and implants, should benefit from the use of GO, which may increase mineralized nodule formation, stimulate biomineralization, and accelerate bone regeneration.

Graphene oxide (GO) is a highly oxidized form of graphene prepared by oxidation of graphite [1, 2]. It consists of a flat monolayer of carbon atoms in a two-dimensional honeycomb lattice with a high aspect ratio layer geometry and very high specific surface area [3]. GO contains a range

& Daniela C. Zancanela danielaquimica@gmail.com

Pietro Ciancaglini pietro@ffclrp.usp.br

¹ Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil

² Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil
of reactive oxygen functional groups, including epoxide, carboxyl, and hydroxyl groups. These groups exist on the basal plane and edges of GO and allow GO to interact with proteins through covalent, electrostatic, and hydrogen bonding. GO sheets are more hydrophilic than graphene

Copyright © 2016 American Scientific Publishers

All rights reserved

Printed in the United States of America

Article

Journal of
Nanoscience and Nanotechnology

Vol. 16, 9487–9496, 2016

www.aspbs.com/jnn

Comparative Studies of Carbon Nanotubes: Implications for Alkaline Phosphatase Activity and Mineralized Matrix in Osteoblasts Cultures

Daniela Cervele Zancanela¹, Amanda Natalina de Faria², Ana Maria Sper
Simão¹,

Elaine Yoshiko Matsubara¹, José Maurício Rosolen¹, and Pietro Ciancaglini^{1,*}

¹Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
(FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP), 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

²Depto. Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – Universidade de
São Paulo (USP),
14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Estrogen and phenol red free medium for osteoblast culture: study of the mineralization ability

A. N. de Faria · D. C. Zancanela · A. P. Ramos ·
M. R. Torqueti · P. Ciancaglini

Received: 13 October 2014/Accepted: 12 January 2015/Published online: 30 January 2015
Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract To design an estrogen and phenol red free medium for cell culture and check its effectiveness and safety on osteoblast growth it is necessary to maintain the estrogen receptors free for tests. For this purpose, we tested some modifications of the traditional culture media: estrogen depleted fetal bovine serum; estrogen charcoal stripped fetal bovine serum and phenol red free a-MEM. The aim of this work is to examine the effects of its depletion in the proliferation, differentiation, and toxicity of mesenchymal stromal cells differentiated into osteoblasts to obtain an effective interference free culture medium for in vitro studies, focused on non-

previously studied estrogen receptors. We performed viability tests using the following techniques: MTT, alkaline phosphatase specific activity, formation of mineralized matrix by Alizarin technique and analysis of SEM/EDX of mineralized nodules. The results showed that the culture media with estrogen free a-MEM ? phenol red free a-MEM did not impact viability, alkaline phosphatase activity and mineralization of the osteoblasts culture compared to control. In addition, its nodules possess Ca/P ratio similar to hydroxyapatite nodules on the 14th and 21st day. In conclusion, the modified culture medium with phenol red free a-MEM with estrogen depleted fetal bovine serum can be safely used in experiments where the estrogen receptors need to be free.

A. N. de Faria · M. R. Torqueti
Depto. Análises Clínicas, Toxicológicas e
Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida do
Café, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil e-mail:
amandabioquimica@gmail.com; amandafaria@usp.br

A. N. de Faria
Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São
Paulo (USP), Avenida Bandeirantes, 3900, SP, SP
14040-903, Brazil

D. C. Zancanela · A. P. Ramos · P. Ciancaglini (&) Depto.
Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo,
Brazil e-mail: pietro@ffclrp.usp.br

Keywords Osteoblasts a-MEM Phenol red free
Fetal bovine serum Estrogen depleted

Introduction

Cellular tests are an important manner to ensure the effectiveness and safety of medicines, drugs, and

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

b

Formation of carbonated hydroxyapatite films on metallic surfaces using dihexadecyl phosphate–LB film as template

Israel D. de Souza^a, Marcos A.E. Cruz^a, Amanda N. de Faria^{a,b}, Daniela C. Zancanela^a,Ana M.S. Simão^a, Pietro Ciancaglini^a, Ana P. Ramos^{a,*}

^a Departamento de Química-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14040-901, SP, Brazil ^b Departamento de Bioquímica e Imunologia-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

article

info

abstract

Article history:

Received 2 January 2014

Received in revised form 4 March 2014

Accepted 12 March 2014 Available online 26 March 2014

Keywords:

Biomaterialization

Langmuir–Blodgett films

Hydroxyapatite

Osteoblasts

1. Introduction

Since the early 1970s, different studies have demonstrated that the titanium bioactivity alone is not high enough to induce direct bone tissue growth [1,2]. This has driven researchers to search for various techniques to grow bioactive ceramics [3], specially apatites, and deposit them on titanium surfaces [4,5], aiming to increase the osteointegration related to the surface chemistry and topography and thus control tissue–implant interactions and diminish the fixation time [2,6]. Among the various coating procedures, the plasma spraying technique is the most often employed for biomedical applications regarding bone substitution implants [7,8]. However, this process poses several difficulties: (1) it requires extremely high temperatures and expensive equipment; (2) it does not elicit well-organized growth, so the mineral arises in nonspecific sites; (3) it cannot cover porous surfaces or incorporate biologically active agents [9]; and (4) the poor coating–substrate binding frequently culminates in serious clinical problems [10].

Hydroxyapatite serves as a bioactive material for biomedical purposes, because it shares similarities with the inorganic part of the bone. However, how this material deposits on metallic surfaces using biomimetic matrices remains unclear. In this study, we deposited dihexadecyl phosphate, a phospholipid that bears a simple chemical structure, on stainless steel and titanium surfaces using the Langmuir–Blodgett (LB) technique; we employed the resulting matrix to grow carbonated hydroxyapatite. We obtained the calcium phosphate coating via a two-step process: we immersed the surfaces modified with the LB films into phosphate buffer, and then, we exposed the metal to a solution that simulated the concentration of ions in the human plasma. The latter step generated carbonated hydroxyapatite, the same mineral existing in the bone. The free energy related to the surface roughness and composition increased after we modified the supports. We investigated the film morphology by scanning electron and atomic force microscopies and determined surface composition by infrared spectroscopy and energy dispersive X-ray. We also studied the role of the surface roughness and the surface chemistry on cell viability. The surface modified Ti significantly increased osteoblastic cells proliferation, supporting the potential use of these surfaces as osteogenic materials.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.029> 0927-7765/© 2014

Elsevier B.V. All rights reserved.

In this sense, the assembly of biomimetic apatite composites guided by naturally occurring biological molecules like phospholipids and proteins represents an interesting strategy [11,12]. The spreading of insoluble lipids on air/water interface affords Langmuir monolayers, which constitute a well-known matrix for calcium phosphate and carbonate growth [13,14]. Nevertheless, few studies have reported on the transfer of Langmuir monolayers to solid supports, the so-called Langmuir–Blodgett (LB) films, to grow minerals, especially calcium phosphates (Ca–P) [15,16]. Organic LB matrices enable nucleation of the first mineral seeds, guiding the subsequent growth process at the nanoscale level [17,18]. Zhang et al. [15] observed that calcium phosphates nanodots, nanowires, and nanoislands originate on the matrix during the early nucleation stages, depending on the stearic acid LB films orientation. A further advantage of these matrices is that they are biocompatible and consist of lipids, and proteins, mimicking the cell wall structure. Also, the lipids bind strongly to the solid surfaces [19] improving attachment of the biomaterial grown as guided by the LB matrix. Kokubo et al. [20] studied another important biomimetic approach consisting of a method that is currently used to grow hydroxyapatite (HAP) through surface exposure to simulated body fluid (SBF) [21]. This supersaturated solution mimics the ionic composition of human blood plasma and helps to evaluate the

* Corresponding author. Tel.: +55 16 36020204.

E-mail addresses: anapr@ffclrp.usp.br, anapr@usp.br (A.P. Ramos).