

**UNIVERSIDADE DE UBERABA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - MESTRADO**  
**ACADÊMICO**

**GABRIELLA TOSTA SILVA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA DO**  
**TITÂNIO REVESTIDO COM QUITOSANA**

**UBERABA – MG**

**2024**



**GABRIELLA TOSTA SILVA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA DO  
TITÂNIO REVESTIDO COM QUITOSANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Mestrado Acadêmico da Universidade de Uberaba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto

**UBERABA – MG**

**2024**

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

S38a Silva, Gabriella Tosta.  
Avaliação *in vitro* da resposta inflamatória e citotóxica do titânio revestido com quitosana / Gabriella Tosta Silva. – Uberaba, 2024.  
38 f. : il., color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto.

1. Implantes dentários endoósseos. 2. Osseointegração. 3. Odontologia. I. Pinto, Marcelo Rodrigues. II. Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada. III. Título.

CDD 617.693

**GABRIELLA TOSTA SILVA**

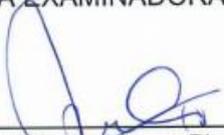
**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA DO  
TITÂNIO REVESTIDO COM QUITOSANA**

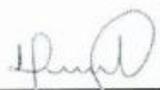
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Mestrado Acadêmico da Universidade de Uberaba, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Aprovado (a) em: 04/03/2024

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto  
Orientador  
Universidade de Uberaba

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª. Denise Tornavoi de Castro  
Universidade de Uberaba

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** RODRIGO GALO  
Data: 06/03/2024 18:37:50-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rodrigo Galo  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto  
da Universidade de São Paulo



## **DEDICATÓRIA**

À Deus, pela vida, por me amparar e conceder forças, saúde e sabedoria para conquistar os meus objetivos.

À São Pedro, por sempre me iluminar, proteger e guiar os meus caminhos.

Aos meus pais, Anderson e Flávia, por todo amor, ensinamentos, me instruindo sempre seguir os caminhos da competência, seriedade e dignidade, sendo os meus exemplos de vida.

Aos meus tios Bárbara Beatriz e Carlos José, por não medirem esforços e sempre me oferecerem todo suporte desde o princípio dos meus estudos.

À toda minha família, em especial às minhas avós Geni e Vanilda, irmã Marcella, cunhado Rafael, padrasto Leandro, familiar José Roberto, prima Nathália, por todo incentivo, amparo e companheirismo.



## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto, por todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados, pela disponibilidade, flexibilidade em todos os momentos necessários e por toda paciência nas explicações. Obrigada pela oportunidade e por fazer parte de todo meu crescimento profissional e pessoal.



## AGRADECIMENTOS

À Universidade de Uberaba (UNIUBE), por meio do Reitor Prof. Dr. Marcelo Palmério.

A Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão por meio do Pró-Reitor Prof. Dr. André Luís Teixeira Fernandes.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba, na pessoa do coordenador Prof. Dr. César Penazzo Lepri.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão do apoio financeiro através da bolsa de mestrado PROSUP/TAXA de estudo.

À Flávia Michele da Silva, secretária do Curso de Pós-Graduação da Universidade de Uberaba, pela disponibilidade e assistência.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), pela colaboração na realização da confecção da liga experimental de titânio revestida com quitosana. Especialmente ao Prof. Dr. Rodrigo Galo.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), pela colaboração e apoio durante a realização do experimento. Especialmente ao Prof. Marcos Vinícius da Silva.

À Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista (UNESP), pela colaboração na produção das ligas experimentais de titânio. Especialmente a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Rosifini Alves Claro.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), pela colaboração na confecção das camadas de quitosana. Especialmente a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ramos.



## RESUMO

Este estudo *in vitro* propôs uma pesquisa inovadora na ampliação do conhecimento a respeito da quitosana como biomaterial com potencial para aplicabilidade nas áreas biomédica e odontológica. O trabalho explorou as características topográficas de uma liga de titânio revestida com quitosana, assim como a viabilidade celular, citotoxicidade e resposta inflamatória. Foram utilizadas amostras em forma de discos ( $\text{Ø}13 \times 2 \text{ mm}$ ) compostos por titânio comercialmente puro maquinado e cada experimento contou com um “n” amostral igual a 4. Os discos passaram por caracterização através da técnica layerblayer (LbL) sendo depositadas as 20 camadas de quitosana e avaliados pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA). A viabilidade da linhagem celular VERO, exposta a liga de titânio foi avaliada pelo ensaio de resazurina. A citotoxicidade dos discos avaliada pela citometria de fluxo e a resposta inflamatória analisada através da concentração de citocinas IFN- $\gamma$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  por meio do ensaio imunoenzimático ELISA. Os dados da rugosidade e resposta inflamatória foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós teste de Tukey. Para análise de viabilidade e citotoxicidade realizou-se testes de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn’s. Para todos os testes estatísticos foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ . A caracterização topográfica do material revestido apresentou uma homogeneização na distribuição de quitosana. As células VERO CCL-81 mostraram viáveis quando expostas a superfície revestida com quitosana. As análises de citotoxicidade mostraram que o material revestido com quitosana apresentou baixa indução de apoptose quando comparado ao Ti não revestido, tornando-se constatado através dos resultados da avaliação da resposta inflamatória frente às citocinas que evidenciaram dados semelhantes ao do controle celular. Através de testes *in vitro*, o Ti com quitosana mostrou baixa indução de células apoptóticas, redução da citotoxicidade e não induziu resposta inflamatória mediante aos ensaios de liberação de citocinas.

Palavras-chave: Osseointegração; Quitosana; Tratamento de superfície; Viabilidade.



## ABSTRACT

This in vitro study proposed innovative research to expand knowledge about chitosan as a biomaterial with potential for applicability in the biomedical and dental areas. The work explored the topographic characteristics of a titanium alloy coated with chitosan, as well as cell viability, cytotoxicity and inflammatory response. Samples in the form of discs ( $\text{\O}13 \times 2 \text{ mm}$ ) composed of commercially pure machined titanium were used and each experiment had a sample "n" equal to 4. The discs underwent characterization using the layer-by-layer (LbL) technique, with 20 layers being deposited of chitosan and evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (MFA). The viability of the VERO cell line exposed to titanium alloy was evaluated by the resazurin assay. The cytotoxicity of the discs was assessed by flow cytometry and the inflammatory response was analyzed through the concentration of cytokines IFN- $\gamma$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  using the enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. The roughness and inflammatory response data were subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post test. For viability and cytotoxicity analysis, the Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test were performed. For all statistical tests, differences with  $p < 0.05$  were considered significant. The topographic characterization of the coated material showed a homogenization in the distribution of chitosan. VERO CCL-81 cells were viable when exposed to chitosan-coated surface. Cytotoxicity analyzes showed that the material coated with chitosan showed low induction of apoptosis when compared to uncoated Ti, which was confirmed through the results of the evaluation of the inflammatory response to cytokines, which showed data similar to that of the cellular control. Through in vitro tests, Ti with chitosan showed low induction of apoptotic cells, reduced cytotoxicity and did not induce an inflammatory response through cytokine release assays.

Keywords: Osseointegration; Chitosan; Surface treatment; Viability.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	<b>13</b>
2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	<b>13</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>14</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
4.1 <i>Material Revestido</i> .....	<b>15</b>
4.2 <i>Deposição das camadas de quitosana pela técnica camada por camada layer-by-layer (LbL)</i> .....	<b>15</b>
4.2.1 <i>Tratamento das Superfícies com Quitosana</i> .....	<b>15</b>
4.2.2 <i>Montagem das Camadas por Meio da Técnica LbL</i> .....	<b>16</b>
4.3 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	<b>16</b>
4.4 <i>Microscopia de Força Atômica (MFA)</i> .....	<b>17</b>
4.5 <i>Cultivo Celular</i> .....	<b>17</b>
4.6 <i>Análise dos Dados</i> .....	<b>19</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
5.1 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do Material Revestido</i> .....	<b>20</b>
5.2 <i>Microscopia de Força Atômica (MFA) do Material Revestido</i> .....	<b>20</b>
5.3 <i>Cultivo Celular Exposto ao Material Revestido</i> .....	<b>22</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>31</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>36</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>38</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O titânio (Ti) é considerado um material que desperta relevância por apresentar características físicas e químicas atrativas (SAGHIRI *et al.*, 2016; BRONZE-UHLE *et al.*, 2019). É usado em várias aplicações industriais, tais como, produtos alimentícios, cosméticos, tintas e frequentemente nas áreas biomédica e odontológica em fabricação de implantes e sistemas de fixação (KIM *et al.*, 2019; RADICE *et al.*, 2020).

Na área odontológica o Ti é um elemento significativo quando associado a reabilitação oral, visto que esta é um conjunto de condutas capaz de restituir a função e a estética de elementos dentais perdidos através de tratamento protético baseado na instalação de implantes dentários. Estes dispositivos quando instalados segue uma organizada sequência de processo cicatricial iniciando pela hemostasia, seguida da inflamação, proliferação e a remodelação, envolvendo ação de citocinas, proteínas e pequenas células para que haja a secreção da matriz de colágeno pelas células osteoblásticas e assim a formação de um novo tecido ósseo (TERHEYDEN *et al.*, 2012; STEPANOVSKA *et al.*, 2020), que será fundamental para o sucesso desse tratamento reabilitador, havendo um contato entre o osso alveolar e a superfície do implante chamado de osseointegração (GALLI *et al.*, 2013; SURMENEV *et al.*, 2014; ELIAS *et al.*, 2015; NAJEEB *et al.*, 2019).

O sucesso dos implantes depende tanto da osseointegração eficiente, quanto da estabilidade primária. No entanto, existem sérios problemas correlacionados à biocompatibilidade, à vista disso o titânio possui propriedades superficiais hidrofóbicas, o que resulta em uma interface negativa ao interagir com células biológicas impedindo assim adesão celular, além disso outros fatores podem interferir nesta adesão, tais como, trauma cirúrgico excessivo, infecção, disfunção metabólica e sobrecarga levando à falha do implante (BRONZE-UHLE *et al.*, 2019; HE *et al.*, 2019).

De maneira geral, essa falha do implante está relacionada com os processos químicos, eletroquímicos e mecânicos resultando em uma tribocorrosão. Este processo ocorre quando há um ambiente corrosivo, ou seja, a ruptura ou dano da camada protetora de óxido e a liberação de íons e detritos gerados nesta degradação (DELGADO-RUIZ *et al.*, 2018; TRINO *et al.*, 2018) juntamente com ação mecânica das forças de mastigação (GOLVANO *et al.*, 2015).

Sendo assim, a tribocorrosão (ação simultânea da corrosão e desgaste) desencadeia reações inflamatórias, pela liberação de compostos que atuam como mediadores inflamatórios, que atraem e ativam diversos tipos celulares como macrófagos e monócitos, cuja ação contribui para mecanismo de reabsorção óssea (BARÃO *et al.*, 2021). Evitar o processo triboquímico é considerado um fator principal na instalação de implantes dentários, uma das formas encontradas para alcançar este objetivo, foi a modificação da superfície do titânio, criando novas superfícies mais resistentes a este processo e um melhoramento sobre as reações celulares e teciduais (GOLOZAR *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015; RADICE *et al.*, 2020).

Estudos prévios demonstraram que o processo de osseointegração é significativamente desencadeado pela rugosidade da superfície do implante (WENNERBERG *et al.*, 2009; NAUJOKAT *et al.*, 2019). Existem diversos tratamentos e compostos que modificam as superfícies dos implantes como, métodos por pulverização de plasma, incorporação de hidroxiapatita, revestimentos de alumínio, revestimentos de fosfato de cálcio, jateamento, condicionamento ácido, entre outros que aumentam a adesão celular (RUPP *et al.*, 2018; STEPANOVSKA *et al.*, 2020) e conseqüentemente, contribuem para uma melhor osseointegração (RIBEIRO *et al.*, 2015). Dentre os métodos que modificam a superfície de implantes dentários, o revestimento pela quitosana vem se destacando por ser um composto inovador, economicamente viável e apresentação de características favoráveis.

A quitosana é um material antibacteriano, biodegradável, biocompatível, biofuncional e não tóxico, sendo um polímero natural obtido pela desacetilação da quitina (polissacarídeo, encontrado em exoesqueleto de crustáceos, insetos e paredes celulares de fungos) (MUXIKA *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2021). Tal composto, tem sido utilizado em diversos estudos, dentre estes como um tratamento para modificação da superfície de implantes dentários, através da deposição de quitosana pela técnica camada por camada (LbL) (GOVINDHARAJULU *et al.*, 2017; STEPANOVSKA *et al.*, 2020).

A interação entre quitosana e ligas de titânio é favorecida mediante diferenças entre cargas observadas em ambos. A quitosana é um material catiônico que carrega cargas positivas, por outro lado, a superfície do titânio carrega cargas negativas, assim, observa-se uma atração eletrostática entre os componentes,

resultando na automontagem de multicamadas de polieletrólitos (PEMs), facilitando modular a morfologia e espessura desejada do filme formado. Além disso, é sabido que tais camadas (PEMs) são capazes de acelerar o processo de osseointegração (GOVINDHARAJULU *et al.*, 2017; GARCÍA-CABEZÓN *et al.*, 2021).

No presente estudo, foram avaliadas as características topográficas das camadas de quitosana sobrepostas à liga de titânio, assim como as respostas citotóxica e inflamatória frente a linhagens de células em cultura e provenientes de sangue periférico. A hipótese nula testada foi a de que o revestimento com a quitosana em uma liga de titânio não interferiria na viabilidade celular e respostas inflamatórias e citotóxicas.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

O presente estudo tem por objetivo, avaliar as características topográficas do titânio revestido com camadas de quitosana, bem como a viabilidade celular, citotoxicidade e resposta inflamatória.

### **2.1 Objetivos Específicos**

Avaliar as características topográficas e morfológicas do titânio revestido com quitosana, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA);

Avaliar a viabilidade de células VERO expostas ao titânio revestido com quitosana pelo ensaio de resazurina.

Avaliar a citotoxicidade do titânio revestido com quitosana sobre células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) pela citometria de fluxo com marcação para apoptose.

Avaliar o perfil de citocinas IFN- $\gamma$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  após exposição de PBMCs ao titânio revestido com quitosana por meio de ensaio imunoenzimático ELISA do tipo sanduíche.

### 3 JUSTIFICATIVA

A reabilitação protética através da instalação de implantes dentários apresenta um importante procedimento de escolha na substituição de elementos dentais perdidos. No entanto, o sucesso deste tratamento, depende da relação entre o osso alveolar e a superfície do implante. Tal relação depende de diversos fatores, dentre estes estão a rugosidade e composição da superfície do implante. Dessa forma, a oferta de novos biomateriais aplicados à superfície de implantes é de extrema importância para o desenvolvimento de materiais inovadores e economicamente viáveis. Contudo, quaisquer materiais sejam implantes ou similares, devem passar por inúmeros testes antes de chegarem ao paciente. Assim, o presente estudo se destaca na ampliação do conhecimento a respeito da quitosana como biomaterial com potencial aplicabilidade nas áreas biomédica e odontológica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material Revestido

Para a realização deste estudo, foram utilizadas amostras em forma de discos compostos por titânio comercialmente puro maquinado (Muller Metais, Industria e Com. Ltda., São Paulo, Brasil). Os discos foram confeccionados com medidas de  $\varnothing 13 \times 2$  mm. Cada experimento contou com um “*n*” amostral igual a 4, nesse caso, tanto para os controles quanto para os discos contendo ou não o revestimento de quitosana. Antes dos ensaios todos os discos foram preparados metalograficamente por lixamento em papel iniciando-se com lixa d’água de granulação 180, passando para 240, 360, 400, 600, 800, 1200 e 2000 na presença de água, com velocidade média de 600 rpm e força controlada de 0,5 Kgf e em equipamento de polimento (Lixadeira e Politriz, Modelo PLF, FORTEL Ind. e Com LTDA, São Paulo, SP - Brasil). O polimento final foi realizado com uma pasta de diamante de 1  $\mu\text{m}$  e partículas de sílica coloidal de 0,06  $\mu\text{m}$  de diâmetro acrescido de partículas de alumina de 0,05  $\mu\text{m}$  de diâmetro (*Strues, Glasgow, UK*).

### 4.2 Deposição das camadas de quitosana pela técnica camada por camada *layerbylayer* (LbL)

A confecção das camadas de quitosana foi realizada no Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP).

#### 4.2.1 Tratamento das Superfícies com Quitosana

Para realizar o tratamento da superfície das ligas experimentais de titânio, foi necessário preparar as soluções responsáveis pela formação dos filmes de

quitosana. Dessa forma, foi colocado em um béquer 2,5 mL de ácido acético (Emprove® Expert, Ph. Eur., JP, USP) e 0,25 mg de quitosana dissolvidos em 250 mL de água Milli-QTM. Em outro béquer, foi depositado 0,5 g de ácido poliacrílico também dissolvido em 250 mL de água Milli-QTM, assim, tem-se a solução com 0,2% de ácido. Estas soluções foram aquecidas entre 40-60°C e em constante agitação, sendo 4h a quente e 24h em temperatura ambiente. Em sequência, as soluções foram filtradas por meio de um filtro JET BIOFILR (Econolab, São Paulo – SP – Brasil) com auxílio de uma seringa de 10 mL e transferidas para dois balões de 250 mL.

#### **4.2.2 Montagem das Camadas por Meio da Técnica LbL (*layerbylayer*)**

A montagem LbL na superfície do titânio foi realizada em pH4,5 o que proporcionou uma superfície carregada negativamente e moléculas de quitosana catiônicas carregadas positivamente. Assim, a quitosana atraída eletrostaticamente formou a primeira camada estabilizada no titânio. Com o auxílio de uma bomba infusora, por meio de sua plataforma elevadora, o disco foi imerso em uma solução contendo polielétrons com carga oposta e formou a primeira monocamada por meio de absorção, no caso, a solução de ácido poliacrílico por vinte minutos. As moléculas do substrato sólido absorveram os íons para formação da primeira camada. Depois, realizou-se a lavagem durante cinco minutos, para retirada dos elétrons fracamente ligados ou não ligados utilizando-se água Milli-QTM, esta etapa caracteriza-se por evitar a contaminação cruzada de polielétrons com carga oposta. Logo após, o substrato foi imerso em outra solução de polielétrons com carga oposta para formação da segunda monocamada através da absorção e da solução de quitosana com ácido acético, de modo perpendicular por vinte minutos. Dessa forma, o processo ocorreu por meio da interação por atração de cargas opostas na superfície do titânio e repetido até a realização do número de camadas pesquisadas, neste caso 20 camadas.

#### **4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As superfícies das amostras controle e com deposição de quitosana, foram avaliadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (JSM-610F, JEOL, Tokyo, Japan). Ambas as amostras tiveram as superfícies tratadas por evaporação por carbono no aparelho BAL-TEC SCD 050, antes das análises. Os recobrimentos utilizados visam apenas tornar as amostras condutoras de modo a gerar imagens com boa resolução no MEV. Além disso, amostras potencialmente isolantes tendem a acumular a carga elétrica do feixe primário e geram artefatos na imagem. Deste modo, torna-se necessário o recobrimento das amostras.

#### **4.4 Microscopia de Força Atômica (MFA)**

Foi utilizado o Microscópio de Força Atômica (Microscópio FlexAFMNanoSurf) com controlador C300, resolução de imagem de 256, 512 até 1024 pixels e velocidade de aquisição de 0,25 Hz a 1 Hz, e as imagens foram processadas através o programa Gwyddion – Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCLRP/USP. Esta análise foi baseada no conceito de perfilometria de superfície, onde a ponteira permite escanear a superfície da amostra a fim de mapear a topografia e conformação do crescimento dos filmes de quitosana.

#### **4.5 Cultivo Celular**

A linha celular VERO-CCL-81 é comumente utilizada para a avaliação da viabilidade de acordo com a norma ISO 10993-5: 2009, Biological evaluation of medical devices - Part 5: tests for in vitro cytotoxicity, Ed. Geneva. 3 (2009). Para isso, as células VERO-CCL-81 foram cultivadas em recipientes de cultura T-25 (Nunc) à temperatura de 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com meio RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich, EUA). O meio RPMI foi renovado de 2 a 3 vezes por semana até as células VERO-CCL-81 atingirem uma confluência de 80-90%. Depois disso, as células foram removidas

com 0,25% de tripsina, solução de EDTA 0,53 mM, e cultivadas ( $1 \times 10^6$  células/mL) nas superfícies de Ti com e sem cobertura de quitosana. Após 24h de incubação, as células foram removidas mecanicamente com auxílio de uma pipeta pasteur e avaliadas por meio do ensaio de resazurina, baseado na fluorescência emitida pelo indicador redox (resazurina) à medida que é reduzido pelas células viáveis. Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CAAE – 30474020.2.0000.0008 e Número do Parecer: 3.957.676), as células mononucleares do sangue periférico foram obtidas de um doador saudável por punção venosa em um tubo com EDTA. O sangue total foi misturado com meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de FBS (1:1) (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram contadas em câmara de Neubauer e cultivadas ( $2 \times 10^6$  células/mL) nas superfícies de quitosana e de Ti puro. Após 24h de incubação a uma temperatura de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, os sobrenadantes foram removidos mecanicamente e foi realizada a avaliação da concentração de citocinas IFN- $\gamma$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ . Os linfócitos T CD4+ e T CD8+ coletados a partir dos PBMCs de sangue periférico humano, foram identificados e, dentro dessa população, o percentual de linfócitos marcados para apoptose com Anexina V e 7AAD. Os controles celulares negativos foram utilizados para determinação das regiões de fluorescência. Foram adquiridos 50.000 eventos em citômetro de fluxo FACSCalibur, realizada conforme instruções do fabricante (BD Biosciences, EUA). Os resultados foram analisados no software FlowJo 10.0.6 (TREESTAR). As placas de ELISA contendo 96 poços de alta afinidade a proteínas (Corning-Costar) foram recobertas com anticorpo monoclonal específico de captura (100  $\mu$ l) para os alvos de interesse diluídos no coating indicado e incubadas overnight por 12-16 h a 4°C. Após esse procedimento, as placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween 0,05 % (Sigma®) e bloqueadas a temperatura ambiente por 4 h com 200  $\mu$ l de “PBS BSA 1%” (Sigma®). Em seguida, as placas foram lavadas novamente e 100  $\mu$ l de amostras, em duplicata, foram colocadas para incubação overnight a 4°C. Após nova lavagem foram adicionados 100  $\mu$ l do anticorpo secundário biotilado de detecção e incubados por mais 3 h a temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e incubadas com uma Peroxidase conjugada à streptoavidina (1,25 ng/ml) (GenzymeDiagnostics®, Cambridge) diluída em “assaydiluent” durante 20 min a 37°C. Após três lavagens com PBS Tween, foram adicionados 100  $\mu$ l de reagente

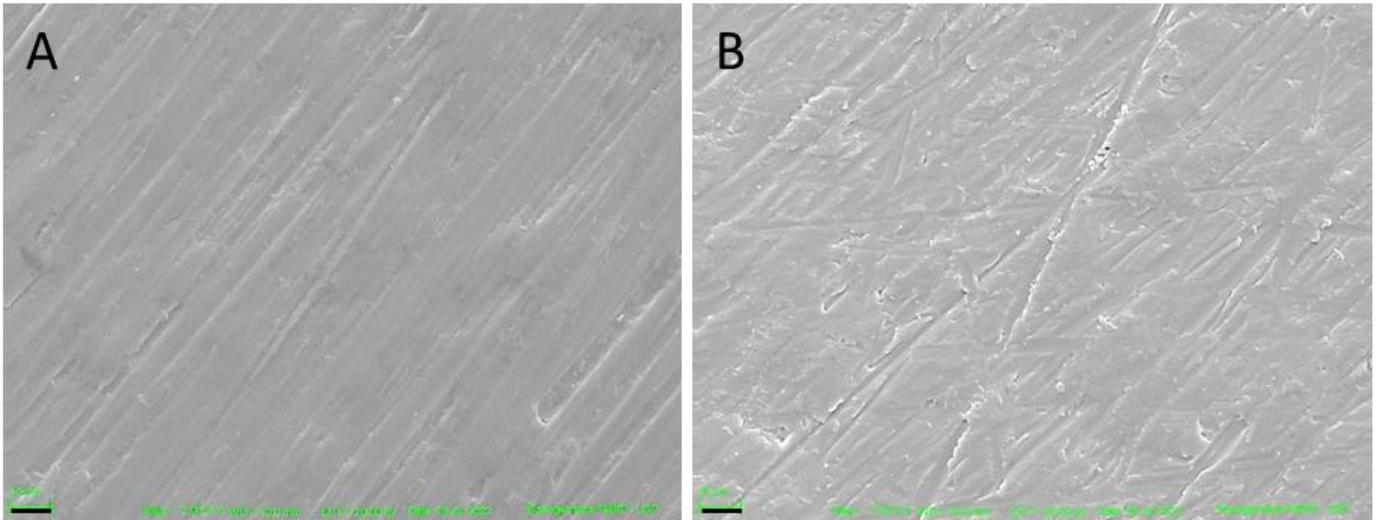
tetrametilbenzidina (TMB - Sigma®) para revelar a reação. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 2 % e a absorbância medida em um comprimento de onda de 450 nm num leitor de ELISA (EnSpire® Multimode Plate Reader, Waltham, Massachusetts, EUA). A concentração das amostras foi estimada por meio da comparação com uma curva padrão feita com as respectivas proteínas recombinantes, empregadas em diluição seriada específica para cada uma. Os resultados da absorbância foram analisados por regressão linear. Os níveis de sobrenadante de cultura foram expressos em picogramas de cada alvo por mililitro de soro.

#### **4.6 Análise dos dados**

Todos os dados foram tabulados no Excel e exportados para o GraphPad Prism 9.0, utilizado para realizar as análises estatísticas. Para realização da análise estatística, onde foi testada a distribuição e variância em todas as variáveis. Os dados da rugosidade e resposta inflamatória foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós teste de Tukey. Para análise de viabilidade e citotoxicidade realizou-se testes de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's. Para todos os testes estatísticos foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do Material Revestido



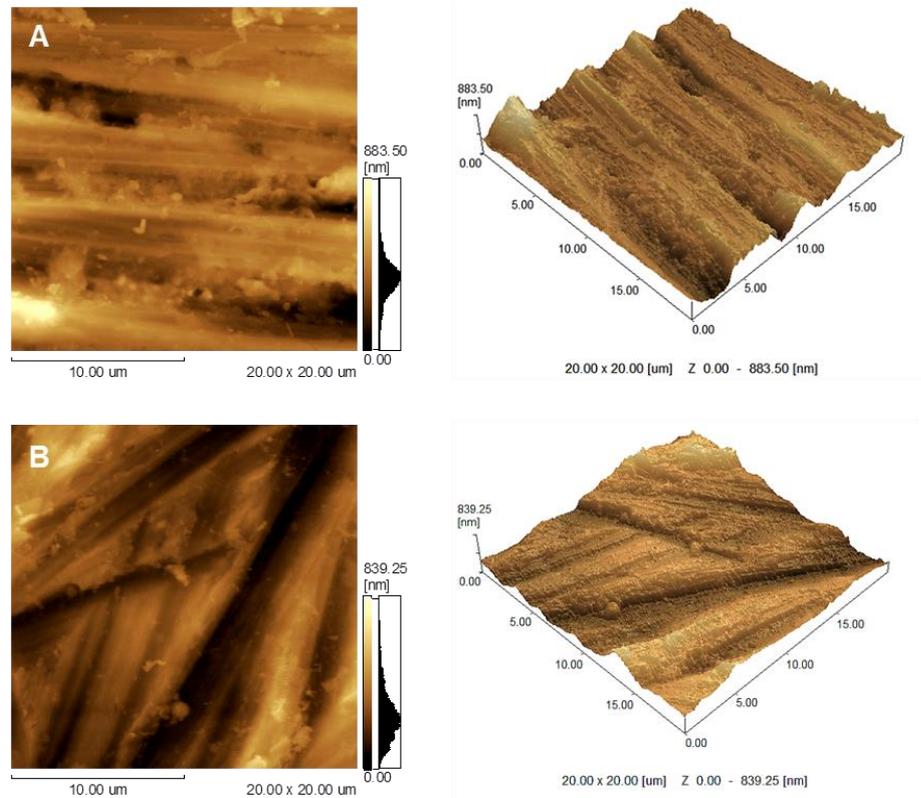
**Figura 1.** Micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) Superfície de Ti sem cobertura de quitosana e (B) com cobertura de quitosana. Escala de 10  $\mu\text{m}$  (barra); Mag = 2.00 KX; EHT = 20.00 KV. Fonte da autora.

A micrografia da figura 1A mostra a superfície do disco polida antes do tratamento de superfície, enquanto a 1B mostra a superfície do disco de titânio coberto com quitosana. As ranhuras observadas em ambas às micrografias são provenientes da técnica de polimento. Um padrão de distribuição homogênea pode ser observado após a deposição de quitosana pela técnica camada por camada (LbL).

### 5.2 Microscopia de Força Atômica (AFM) do Material Revestido

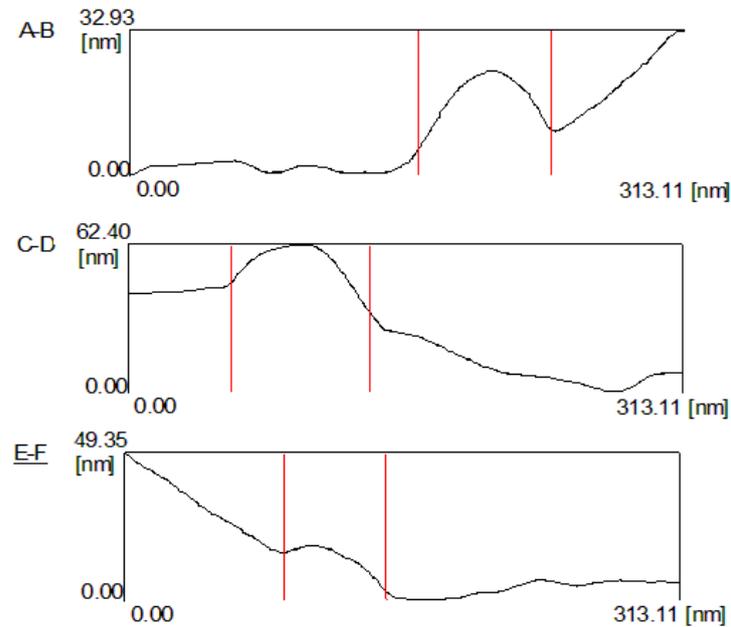
A topografia da superfície de Ti revestida e não revestida por quitosana obtida por microscopia de força atômica (AFM) é mostrada na figura 2. As imagens em 2D e 3D mostram a deposição da quitosana sobre o disco de Ti (Fig. 2B). Pouca

granulação foi observada demonstrando que a superfície criada possui uma camada uniforme.



**Figura 2.** Imagens de microscopia de força atômica (AFM) de superfícies não revestidas e revestidas com quitosana. (A) Superfície de Ti não revestida; (B) Superfície de Ti revestida com 20 camadas de quitosana. Imagens 2D (esquerda) e 3D (direita) representativas das superfícies. A área digitalizada apresentada é de 20 × 20 µm. Fonte: da autora

Além disso, a deposição de quitosana sobre o Ti gera uma camada mais rugosa comparada ao Ti sem tratamento de superfície, apresentando rugosidade média de  $72,97 \pm 2,18$  nm para Ti sem quitosana e de  $102,69 \pm 4,10$  nm para Ti com quitosana. Adicionalmente, a figura 3 e a tabela 1 mostram regiões e valores utilizados para a análise da área e ângulo observados na superfície de Ti revestida com quitosana.



**Figura 3.** Área representativa da superfície de quitosana. Os gráficos mostram áreas delimitadas (picos e vales) utilizadas para obtenção de medidas como altura, largura e ângulo. Fonte: da autora.

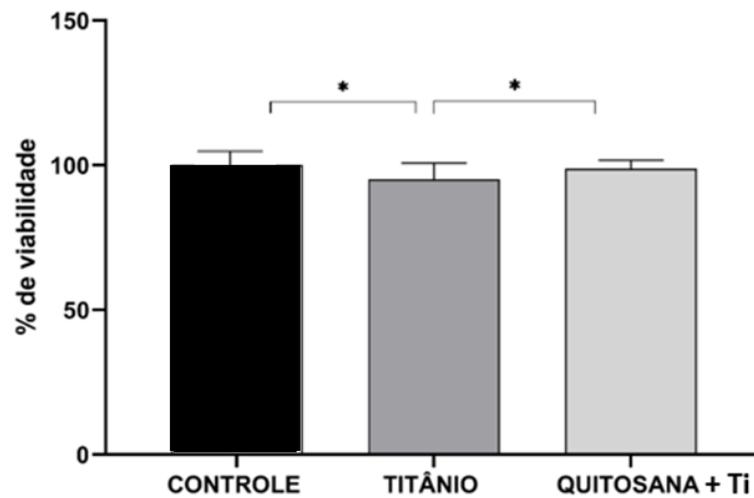
**Tabela 1.** Medidas de picos e vales da superfície com quitosana.

Intervalo	Largura (nm)	Altura (nm)	Ângulo (grau)
<b>A-B</b>	74,6	4,4	3,4
<b>C-D</b>	78,8	12,6	9,1
<b>E-F</b>	58,6	13,1	12,6
<b>A-F</b>	70,6 ± 10,6	10,5 ± 4,9	8,4 ± 4,6

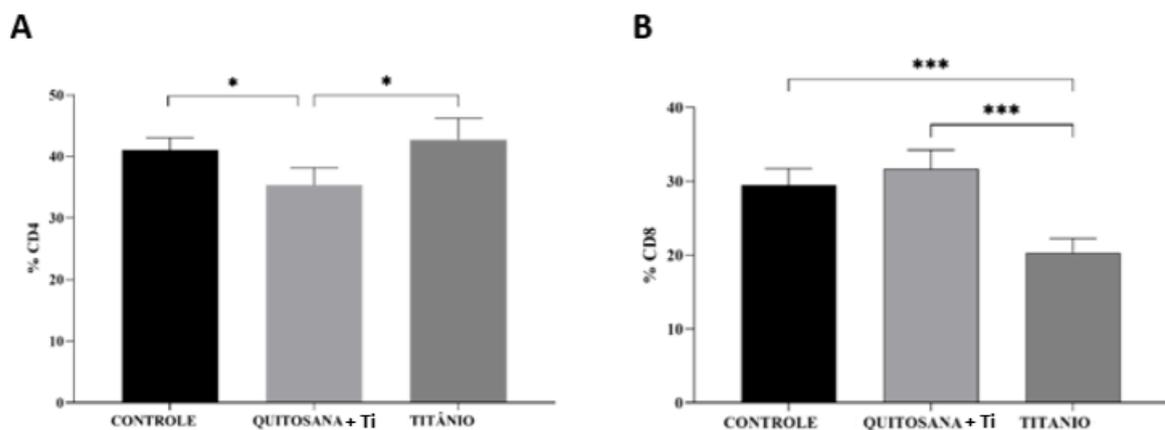
Fonte: da autora.

### 5.3 Cultivo Celular Exposto ao Material Revestido

A biocompatibilidade da cobertura de quitosana foi analisada por ensaios de viabilidade celular. Os dados observados na figura 4 mostram que células da linhagem VERO-CCL-81 apresentam viabilidade em torno de 98% quando expostas a superfície revestida com quitosana.



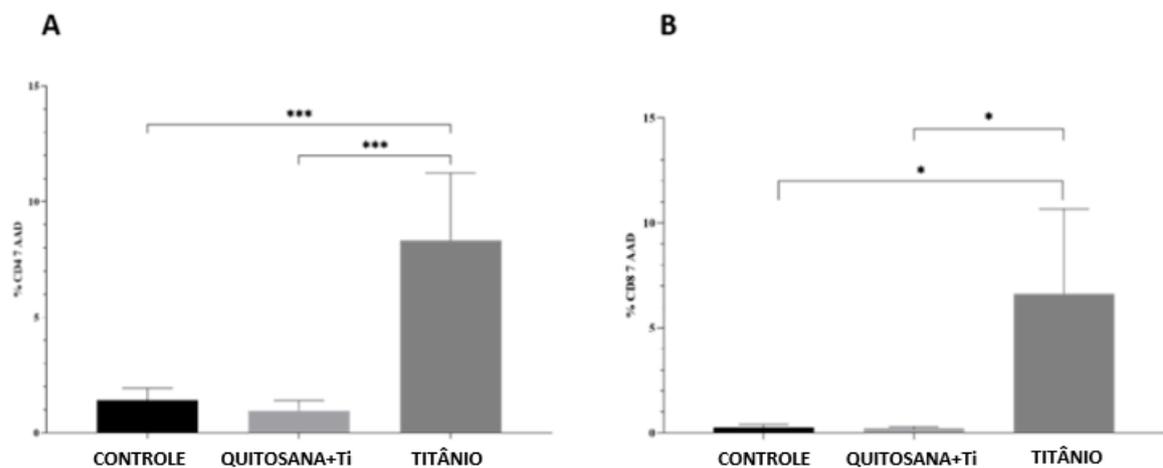
**Figura 4.** Redução da resazurina expressa em porcentagem de viabilidade celular por células VERO-CCL-81 expostas ao controle, titânio puro ou com titânio coberto com quitosana. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's.



**Figura 5.** Comparação do percentual total de linfócitos T CD4+ (A) e T CD8+ (B) após tratamento com quitosana, titânio puro frente ao controle de células. Linhas representam média e desvio padrão. Foram considerados significativos valores com  $p < 0,05$ . Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's.

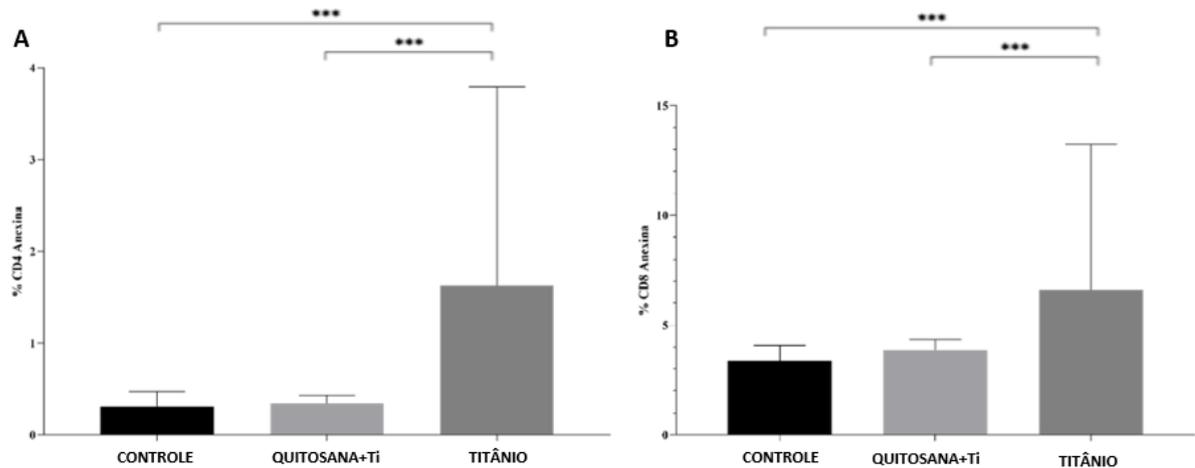
A figura 5.A, mostra os resultados observados quanto ao perfil de células apoptóticas (linfócitos T CD4+) coletados de sangue periférico humano. Houve uma

ativação dos linfócitos em média de 35% a 40% na liga experimental de Ti revestida com quitosana, não apresentando diferenças significativas em relação ao controle e o titânio bruto que apresentaram marcação em torno de 40%. Na figura 5.B, mostram uma ativação de células apoptóticas (linfócitos T CD8+) aproximadamente 30% tanto na liga experimental de Ti revestida com quitosana, quanto para o controle, não apresentando diferenças significativas. Em ambos os gráficos A e B, mostram que menos da metade dos linfócitos T CD4+ e TCD8+ foram ativados, sendo sensibilizados pelo revestimento de quitosana, não apresentando diferenças significativas em relação ao controle de células PBMCs.



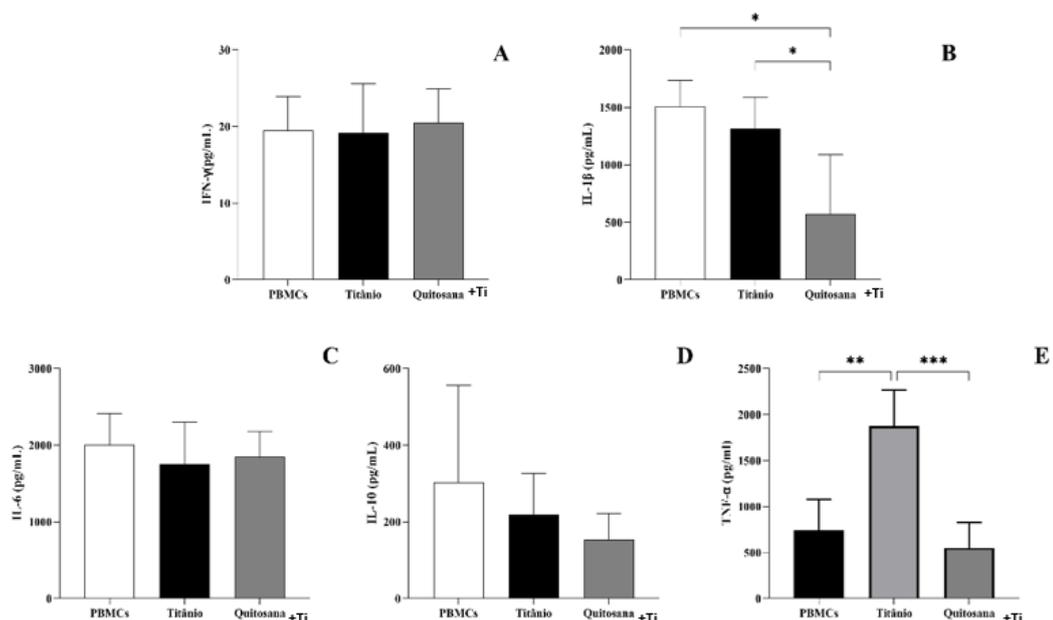
**Figura 6.** Comparação do percentual de linfócitos T CD4+ (A) e T CD8+ (B) marcados com 7AAD, após tratamento com quitosana, titânio puro frente ao controle de células. Representado média +- DP. Análise estatística utilizando análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós teste de Tukey. Foram considerados significativos valores com  $p < 0,05$ .

Na figura 6.A e B mostram os linfócitos T CD4+ e TC8+ marcados com 7AAD, em ambos os gráficos a liga experimental coberta com quitosana apresentou uma média de 3% de ativação das células apoptóticas e o Ti sem revestimento apresentou uma média de 10% de ativação das células apoptóticas.



**Figura 7.** Comparação do percentual de linfócitos T CD4+ (A) e T CD8+ (B) marcados com ANEXINA V, após tratamento com quitosana, titânio puro frente ao controle de células. Representado média +- DP. Análise estatística utilizando análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós teste de Tukey. Foram considerados significativos valores com  $p < 0,05$ .

Na figura 7.A e B os linfócitos T CD4+ e TC8+ marcados com ANEXINA V, apresentaram ativação de células apoptóticas de 0,05% em ambos os gráficos para a liga experimental de Ti com quitosana. Não apresentando diferenças significativas em relação ao controle de PBMCs. O Ti sem revestimento em TCD4 ativou 2% de células apoptóticas e TCD8 apresentou uma média de 7% de ativação das células apoptóticas.



**Figura 8.** Avaliação da concentração das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), IL-10 (D) e TNF- $\alpha$  (E), em PBMCs sem tratamento e tratados com quitosana, titânio puro frente ao controle de células. Representado média  $\pm$  DP. Análise estatística utilizando análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós teste de Tukey. Foram considerados significativos valores com  $p < 0,05$ .

Os gráficos da figura 8 mostram os ensaios de liberação de citocinas após exposição de células de sangue periférico (PBMCs) com a superfície revestida, não revestida, titânio puro frente ao controle de células. Os dados mostram que as dosagens das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle e ao material não revestido. Entretanto, a dosagem observada para IL1- $\beta$  mostrou uma menor concentração dessa citocina comparada frente ao controle e ao Ti. Além disso, para TNF- $\alpha$  foi observado uma menor concentração para o Ti revestido comparado ao Ti não revestido.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a viabilidade, citotoxicidade e resposta inflamatória de uma liga de titânio revestida com quitosana frente a células de mamíferos *in vitro*. Os achados mostram que o revestimento de quitosana aumenta a viabilidade celular, diminui a citotoxicidade e não induz resposta inflamatória. Além disso, mostra que a técnica de deposição do material sobre o titânio gera uma superfície homogênea e pouco rugosa.

Materiais compostos de quitosana ganharam um interesse significativo nos campos da engenharia odontológica e de implantes devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, natureza antibacteriana intrínseca e por oferecer reações mínimas com um corpo estranho, sendo apresentado como material candidato para regeneração óssea e osso artificial na engenharia de tecidos, bem como para outras aplicações nos campos da odontologia (DI MARTINO et al., 2005; VENKATESAN et al., 2010; LADIË et al., 2021). De fato, a quitosana possui várias características desejáveis, e estas propriedades a tornam um biomaterial digno de nota para várias aplicações. No entanto, as limitações existentes, como estabilidade em soluções aquosas e características mecânicas colocaram algumas restrições em seu uso na engenharia de tecido ósseo. Em DI MARTINO et al., 2005, “*scaffolds*” puros de quitosana foram fabricados com sucesso; no entanto, muitos estudos foram realizados para eliminar as restrições relacionadas a implantes puros de quitosana, combinando quitosana com aditivos, materiais à base de carbono ou polímeros (XU et al., 2005; WANG et al., 2005).

Em nosso estudo, vinte camadas de quitosana foram depositadas sobre uma liga de titânio pela técnica *layer-by-layer* (LbL). Os dados obtidos por microscopia de força atômica (AFM) mostram a formação de uma superfície homogênea que acompanha os riscos decorrentes do processo de lixamento. O valor de rugosidade obtido foi de  $102,69 \pm 4,10$  nm para o titânio revestido com quitosana e de  $72,97 \pm 2,18$  nm para a liga não revestida.

A superfície de um biomaterial deve oferecer às células condições para que se adaptem e desenvolvam. Ao mesmo tempo, é desejável que sejam inertes para que não induzam respostas adversas por parte do paciente. Estudos mostraram que

uma maior rugosidade superficial influencia positivamente na adesão celular, melhorando a osseointegração, e aumentando a resposta óssea inicial a um implante dentário (CHO et al., 2019; STEPANOVSKA et al., 2020). No entanto, existem tratamentos que modificam as propriedades das superfícies de Ti e são capazes de desencadear reações, afetando estruturas biológicas (MASSARO et al., 2002).

A biocompatibilidade é uma das propriedades fundamentais dos metais implantáveis e estabelece a interação entre o metal e o corpo humano. Nesse sentido, a linha celular VERO-CCL-81 é comumente utilizada para a avaliação da biocompatibilidade de acordo com a norma ISO 10993-5: 2009. Nossos dados mostram que tais células apresentam uma viabilidade de 98% após exposição à liga de titânio revestida com quitosana e, embora o termo biocompatibilidade seja comumente aceitável para estudos *in vivo*, os achados sugerem que a interação titânio quitosana promove um ambiente propício para o desenvolvimento celular; corroborando com estudos que mostraram resultados favoráveis sobre a biocompatibilidade do titânio quando modificado por quitosana (BHATTARAI et al., 2005; LV et al., 2014; GARCÍA-CABEZÓN et al., 2021).

A característica antibacteriana e antifúngica da quitosana foi comprovada por diversos autores, e a hipótese mais aceita é de que a quitosana interfere no metabolismo celular (GOVINDHARAJULU et al., 2017; GONG et al., 2024). Além disso, estudos mostram a quitosana com agente antiproliferativo e pró-apoptótico quando associada a grupamentos sulfato, fenil ou às nanopartículas de estrigol combinada com albumina (JIANG et al., 2011; AL-MALKI et al., 2021). Tais achados nos permitem supor que a quitosana modula negativamente as células no contexto intracelular, mostrando que técnicas eficientes de deposição são fundamentais para evitar sua dispersão e possíveis efeitos tóxicos da quitosana.

Nossos dados mostram que a liga de titânio revestida com quitosana por LbL apresenta baixa citotoxicidade comparada a liga não revestida, sugerindo que a superfície gerada favorece e preserva a interação com as células. Além disso, dosagens de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , IL1- $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  obtidas a partir de cultura de PBMCs, sugerem que a liga revestida com quitosana não induz aumento da inflamação mediada por citocinas, apresentando potencial efeito anti-inflamatório mediante a diminuição de IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , quando comparada a liga não

revestida. De fato, TNF- $\alpha$  está diretamente envolvido na manutenção da inflamação e na ativação dos osteoblastos, induzindo a reabsorção óssea, assim superfícies que atuam induzindo concentrações mais baixas são mais biocompatíveis em longo prazo (LIN et al., 2014).

Diante do exposto, os dados apresentados no presente estudo mostram que a liga de titânio revestida com quitosana obtida pela técnica LbL possui potencial como biomaterial, pois apresenta boa viabilidade, baixa citotoxicidade e não induz inflamação. Tais características mostram que o biomaterial originado tem potencial biocompatibilidade; entretanto, estudos *in vitro* com linhagens de células ósseas e *in vivo* serão considerados em trabalhos futuros.

## 7 CONCLUSÃO

As camadas de quitosana foram depositadas na superfície do disco de Ti usando a técnica de automontagem LbL. Com base nos resultados obtidos por MEV e MFA, a topografia das camadas caracterizadas apresentaram uma deposição homogênea, favorável para adesão celular. Através de testes *in vitro*, a quitosana sendo um material promissor, mostrou células altamente viáveis, apresentando uma boa biocompatibilidade. Além disso, nos ensaios de liberação de citocinas após exposição de células de sangue periférico (PBMCs), o Ti revestido com quitosana apresentou uma baixa indução de células apoptóticas e redução da citotoxicidade e resposta inflamatória.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MALKI, Abdulrahman L. et al. Strigol1/albumin/chitosan nanoparticles decrease cell viability, induce apoptosis and alter metabolomics profile in HepG2 cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 111960, 2021.

BARÃO, Valentim AR *et al.* Prediction of tribocorrosion processes in titanium-based dental implants using acoustic emission technique: Initial outcome. **Materials Science and Engineering: C**, v. 123, p. 112000, 2021.

BHATTARAI, Narayan *et al.* Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. **Biomaterials**, v. 26, n. 31, p. 6176-6184, 2005.

BRONZE-UHLE, Erika S. *et al.* Physicochemical characterization of albumin immobilized on different TiO<sub>2</sub> surfaces for use in implant materials. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 564, p. 39-50, 2019.

CHO, Chang-Bin *et al.* A vitronectin-derived bioactive peptide improves bone healing capacity of SLA titanium surfaces. **Materials**, v. 12, n. 20, p. 3400, 2019.

DI MARTINO, Alberto; SITTINGER, Michael; RISBUD, Makarand V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 30, p. 5983-5990, 2005.

DELGADO-RUIZ, Rafael; ROMANOS, Georgios. Potential causes of titanium particle and ion release in implant dentistry: a systematic review. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, p. 3585, 2018.

ELIAS, Carlos Nelson *et al.* Mechanical properties, surface morphology and stability of a modified commercially pure high strength titanium alloy for dental implants. **Dental Materials**, v. 31, n. 2, p. e1-e13, 2015.

GALLI, Silvia *et al.* Surface characterization and clinical review of two commercially available implants. **Implant dentistry**, v. 22, n. 5, p. 507-518, 2013.

GARCÍA-CABEZÓN, Cristina *et al.* Improved corrosion behavior and biocompatibility of porous titanium samples coated with bioactive chitosan-based nanocomposites. **Materials**, v. 14, n. 21, p. 6322, 2021.

GOLOZAR, M. A. *et al.* Evaluation of corrosion and tribocorrosion of plasma electrolytic oxidation treated Ti-6Al-4V alloy. **Surface and Coatings Technology**, v. 244, p. 29-36, 2014.

GOLVANO, I. *et al.* Influence of fluoride content and pH on corrosion and tribocorrosion behaviour of Ti13Nb13Zr alloy in oral environment. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 49, p. 186-196, 2015.

GONG, Weifeng *et al.* Chitosan inhibits *Penicillium expansum* possibly by binding to DNA and triggering apoptosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 259, p. 129113, 2024.

GOVINDHARAJULU, Jeevan Prasaad *et al.* Chitosan-recombinamer layer-by-layer coatings for multifunctional implants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 369, 2017.

GRABOWSKI, Nadège *et al.* Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages. **International journal of pharmaceutics**, v. 482, n. 1-2, p. 75-83, 2015.

HE, Wulin *et al.* Enhancing osseointegration of titanium implants through large-grit sandblasting combined with micro-arc oxidation surface modification. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 6, p. 1-11, 2019.

ISO, E. N. 10993-5: 2009—Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity (ISO 10993-5: 2009). **German Version**, 2009.

JIANG, Ming *et al.* Chitosan derivatives inhibit cell proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. **Anticancer Research**, v. 31, n. 4, p. 1321-1328, 2011.

KIM, Kyeong Tae *et al.* General review of titanium toxicity. **International journal of implant dentistry**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2019.

LADIÈ, Riccardo *et al.* Supramolecular structuring of hyaluronan-lactose-modified chitosan matrix: Towards high-performance biopolymers with excellent biodegradation. **Biomolecules**, v. 11, n. 3, p. 389, 2021.

LIN, Ming-Hong *et al.* Hybrid ZnO/chitosan antimicrobial coatings with enhanced mechanical and bioactive properties for titanium implants. **Carbohydrate Polymers**, v. 257, p. 117639, 2021.

LIN, Tzu-hua *et al.* Chronic inflammation in biomaterial-induced periprosthetic osteolysis: NF- $\kappa$ B as a therapeutic target. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2014.

MASSARO, C. *et al.* Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, p. 535-548, 2002.

MUXIKA, A. *et al.* Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 1358-1368, 2017.

NAJEEB, Shariq *et al.* Dental implants materials and surface treatments. In: **Advanced dental biomaterials**. Woodhead Publishing, 2019. p. 581-598.

NAUJOKAT, Hendrik *et al.* Surface conditioning with cold argon plasma and its effect on the osseointegration of dental implants in miniature pigs. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 3, p. 484-490, 2019.

OLIVEIRA, Fernando G. *et al.* Understanding growth mechanisms and tribocorrosion behaviour of porous TiO<sub>2</sub> anodic films containing calcium, phosphorous and magnesium. **Applied Surface Science**, v. 341, p. 1-12, 2015.

RADICE, S. *et al.* In-vitro studies on cells and tissues in tribocorrosion processes: A systematic scoping review. **Biotribology**, v. 24, p. 100145, 2020.

RIBEIRO, A. R. *et al.* Micro-arc oxidation as a tool to develop multifunctional calcium-rich surfaces for dental implant applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 54, p. 196-206, 2015.

RUPP, Frank *et al.* Surface characteristics of dental implants: A review. **Dental materials**, v. 34, n. 1, p. 40-57, 2018.

SAGHIRI, Mohammad-Ali *et al.* The role of angiogenesis in implant dentistry part I: Review of titanium alloys, surface characteristics and treatments. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 21, n. 4, p. e514, 2016.

STEPANOVSKA, Jana *et al.* Treatments for enhancing the biocompatibility of titanium implants. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc**, v. 164, n. 1, 2020.

SURMENEV, Roman A.; SURMENEVA, Maria A.; IVANOVA, Anna A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis—a review. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 557-579, 2014.

TERHEYDEN, Hendrik *et al.* Osseointegration—communication of cells. **Clinical oral implants research**, v. 23, n. 10, p. 1127-1135, 2012.

TRINO, Luciana D. *et al.* Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 81, p. 26-38, 2018.

VENKATESAN, Jayachandran; KIM, Se-Kwon. Chitosan composites for bone tissue engineering—an overview. **Marine drugs**, v. 8, n. 8, p. 2252-2266, 2010.

XU, Hockin HK; SIMON JR, Carl G. Fast setting calcium phosphate–chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. **Biomaterials**, v. 26, n. 12, p. 1337-1348, 2005.

WANG, Shao-Feng et al. Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3067-3072, 2005.

WENNERBERG, Ann; ALBREKTSSON, Tomas. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clinical oral implants research**, v. 20, p. 172-184, 2009.

## APÊNDICES



Figura 1. Caracterização topográfica da superfície do titânio com quitosana. A – Amostras em forma de discos compostos por titânio comercialmente puro maquinado (Muller Metais, Industria e Com. Ltda., São Paulo, Brasil). B – O disco com medidas de  $\varnothing 13 \times 2$  mm. C – Representação esquemática da deposição de múltiplas camadas de quitosana sobre o titânio utilizando a técnica de layer-by-layer.

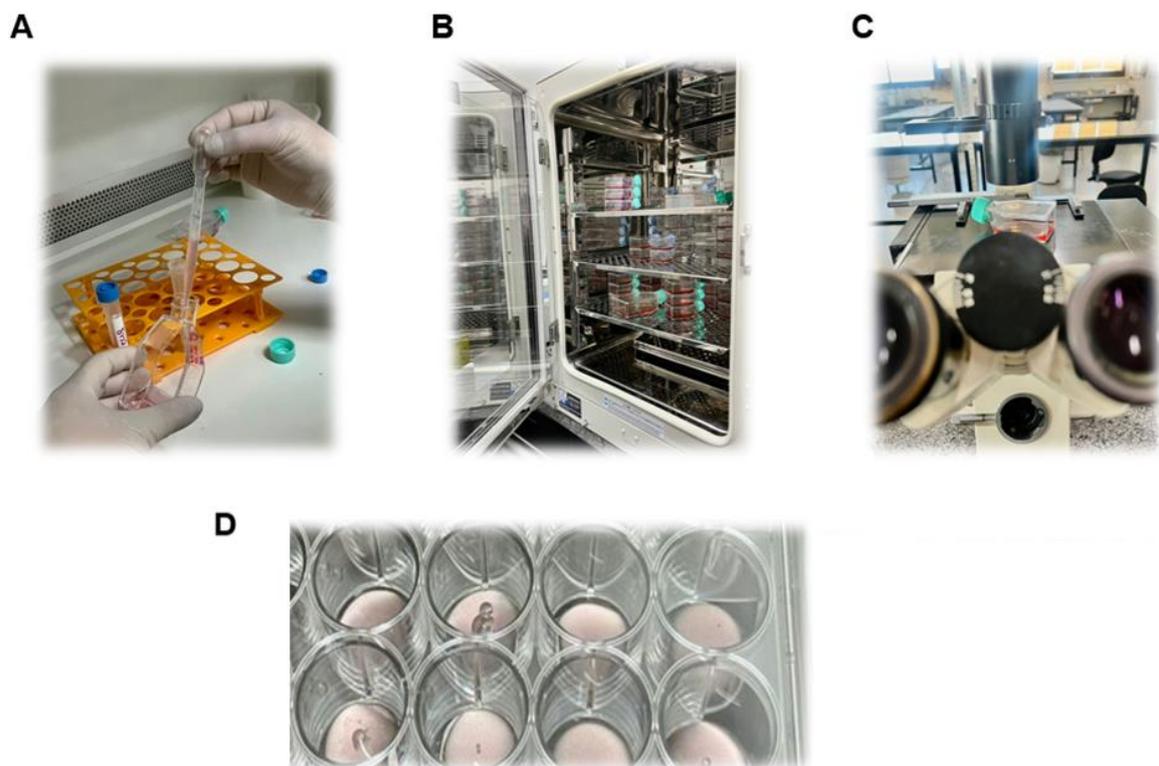


Figura 2. Cultivo celular. A – Células VERO-CCL-81 cultivadas em recipientes de cultura T-25 (Nunc). B – Incubação das células. C – Análise da confluência celular. D – Células semeadas sobre os corpos de prova.

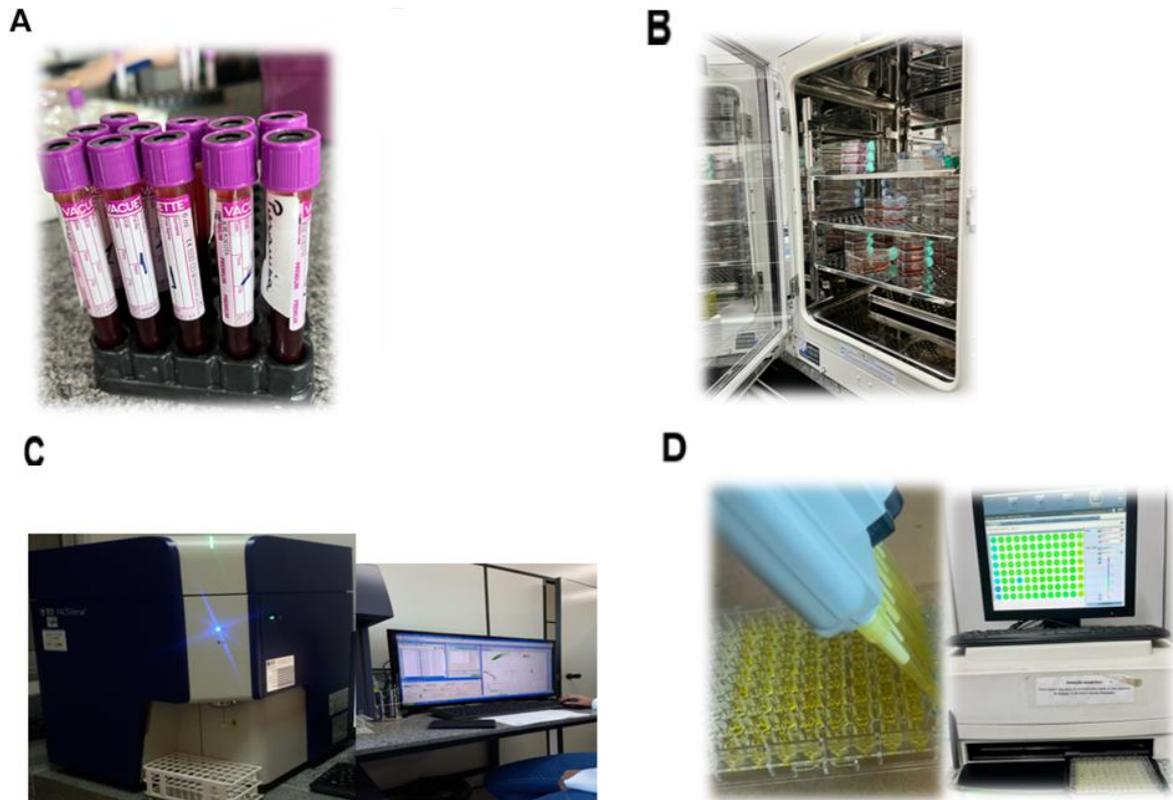


Figura 3. Cultivo celular. A – Células mononucleares do sangue periférico. B – Incubação das células PBMCs. C – Avaliação por citometria de fluxo para apoptose (Citômetro de fluxo FACSCalibur). D – Quantificação das citocinas por ensaio imunoenzimático- ELISA em placas contendo 96 poços (Corning-Costar) e leitor de ELISA (EnSpire® Multimode Plate Reader, Waltham, Massachusetts, EUA).

## ANEXOS

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da resposta imune na infecção pelo Covid-19 em pacientes do município de Uberaba-MG

**Pesquisador:** Virmondes Rodrigues Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 30474020.2.0000.0008

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**Patrocinador Principal:** CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.957.676