



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

JANINE KARLA FRANÇA DA SILVA BRAZ

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS
ENDOTELIAIS DE COELHO E HUMANAS CULTIVADAS SOBRE SUPERFÍCIES
METÁLICAS TRATADAS A PLASMA**

MOSSORÓ-RN
2019

JANINE KARLA FRANÇA DA SILVA BRAZ

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS
DE COELHO E HUMANAS CULTIVADAS SOBRE SUPERFÍCIES METÁLICAS
TRATADAS A PLASMA

Tese apresentada ao Programa de Doutorado
do curso de pós-graduação em Ciência Animal
da Universidade Federal Rural do Semi-Árido
como requisito para obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia Animal.

Orientador: Moacir Oliveira Franco,
Prof. Dr.

Co-orientador: Carlos Eduardo B. Moura,
Prof. Dr.

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

B823c Braz, Janine Karla França da Silva.
Caracterização morfológica e funcional das
células endoteliais de coelho e humanas
cultivadas sobre superfícies metálicas tratadas a
plasma / Janine Karla França da Silva Braz. - 2019.
105 f. : il.

Orientador: Moacir Franco de Oliveira.
Coorientador: Carlos Eduardo Bezerra de Moura.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2019.

1. Biomaterial. 2. Cardiovascular. 3. Plasma.
4. Stent. 5. Viscoelasticidade. I. Oliveira,
Moacir Franco de , orient. II. Moura, Carlos
Eduardo Bezerra de, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

JANINE KARLA FRANÇA DA SILVA BRAZ


**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS
ENDOTELIAIS DE COELHOS E HUMANAS CULTIVADAS SOBRE SUPERFÍCIES
METÁLICAS TRATADAS A PLASMA**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

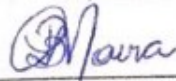
Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal.

Defendida em: 04 / 07 / 2019

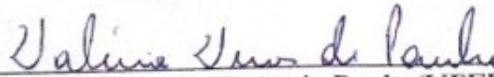
BANCA EXAMINADORA



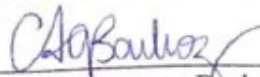
Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)
Presidente



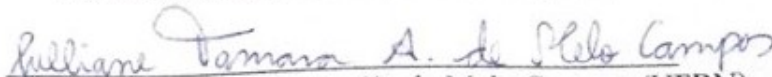
Prof. Dr. Carlos Eduardo B. Moura (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dra. Valéria Veras de Paula (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dr. Carlos Augusto Barboza (UFRN)
Membro Examinador Externo ao Programa



Profa. Dra. Julliane Tamara Araújo de Melo Campos (UFRN)
Membro Examinador Externo ao Programa

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JANINE KARLA FRANÇA DA SILVA BRAZ possui graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2011) e graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2010). Nesse período realizou graduação-sanduiche onde desenvolveu pesquisas na Universidade da Madeira - Portugal (2008). Especialista em Ciências Morfológicas Aplicadas a Saúde e ao Meio Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2013) desenvolveu pesquisas na área cardiovascular de tartarugas marinhas. Mestre em Biologia Estrutural e Funcional pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2015), pesquisando aspectos morfofisiológicos reprodutivos da Distrofia Muscular de Duchenne em camundongos Mdx machos. Realizou seu doutorado pesquisando o efeito do plasma na modificação de superfícies metálicas sobre a biologia de células endoteliais humanas e no modelo de coelho na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, com período sanduíche na Pontificia Universidad Catolica de Chile, investigando as alterações das propriedades mecânicas das células endoteliais sobre superfícies de titânio tratadas a plasma.

DEDICATÓRIA

“Ela fabrica tecidos para vender, e fornece cinturões para os comerciantes. Ela se veste de força e dignidade, e sorri para o futuro.” (Provérbios 31: 25-26) a minha (tia)avó paterna, Elzira França, dedico essas palavras do livro que ela conhecia tão bem e enalteço o quanto a senhora continua sendo uma figura de mulher forte, cativante e sábia.

In Memoriam

“Ela abre a boca com sabedoria, e sua língua ensina com bondade.” (Provérbios 31: 27) a minha avó paterna, Celina França, dedico esse manuscrito. O ensinar com bondade é um dom, e certamente, herdei da senhora. Minha mestra a ti declaro todo meu orgulho de ser sua neta.

In Memoriam

“Ela se levanta ainda é noite, para alimentar a família e dar ordens às empregadas.” (Provérbios 31:15) a minha mãe, Solange Araújo França da Silva, a quem dedico esse trabalho a sua dedicação a família, deu-me o tempo que precisava para investir nos meus sonhos, nos meus estudos, me acrescentou sabedoria para escolher as palavras da ciência para me debruçar e ser pesquisadora.

“Ela se prepara para o trabalho com disposição, e põe em ação a força dos seus braços.” (Provérbios 31:17) a minha avó materna. Iracema Araújo França, que é o elo forte da nossa família. Uma mulher que com a força de suas delicadas mãos cuidou do seu marido, e, cuida dos filhos, netos, bisnetos e tataranetos. Vovó a senhora me fortalece em seu colo até os dias de hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus e Nossa Senhora** pela oportunidade de me refazer e me reinventar. Agradeço por não desistirem de mim e continuarem me usando como instrumento. A jornada até aqui não foi fácil, mas certamente nos próximos desafios estarão ao meu lado, me ajudando a seguir o caminho dos justos.

Agradeço a minha família. Aos meus pais, **Francisco Gilberto da Silva e Solange Araújo França da Silva**, pelas sábias palavras e pelo incentivo para finalizar esse ciclo. Sua filha infelizmente não se tornou médica, mas espero ter me tornado uma doutora de quem vocês possam se orgulhar. Meu irmão, **Rômulo França da Silva**, agradeço pela responsabilidade de ser sua irmã mais velha. Esse é o meu título mais importante nessa vida e, você, o melhor prêmio por essa conquista.

Agradeço a família que estou construindo. Ao meu amado e paciente marido, **João Paulo Araújo Braz**, a palavra “obrigada” não expressa o tamanho da minha gratidão. Mas, muito obrigada por suas duras palavras de realidade, por seu abraço acolhedor quando eu decidi recomeçar, por seus discursos que me desafiavam a ser melhor todos os dias, por suas dúvidas que me faziam procurar respostas, por você se permitir embarcar (literalmente) comigo nessa jornada... acho que poderia escrever uma tese inteira sobre “gratidão a nós”. Porque juntos somos muito mais fortes. A minha filha peluda, **Meg França Braz**, vulgo “Megota”, não seria a mesma coisa escrever uma tese sem seu apoio num delicioso cochilo ao meu lado. E minha diversão no intervalo: brincar com você e todos os seus brinquedos.

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor, **Moacir Oliveira Franco**, por me aceitar como sua orientanda para desenvolver esse trabalho, por sua preocupação e cuidado com a realização dos experimentos e dos resultados desse desafiador assunto. À você “beijos mil”.

Agradeço ao meu querido co-orientador Professor Doutor [Mestre, amigo, psicólogo, pai e conselheiro], **Carlos Eduardo Bezerra de Moura**, por esses incríveis 10 anos de aprendizado. Pelas sábias, palavras amigas e oportunas [*“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro. (Jeremias 29:11)”*]. Obrigada por me conceder a oportunidade de me fazer família, de me ensinar o que é educar com (paciente) amor. A me encorajar a “pegar carona na cauda do cometa”- eu diria que eu peguei carona em uma chuva de meteoros- com você. Gratidão por me apresentar ao universo dos biomateriais,

a expandir a minha curiosidade, afinal já dizia sua avó: “conhecimento não ocupa espaço”, certamente ela entendia muito mais de morfologia do que eu.

Agradeço ao Professor Doutor, **Clodomiro Alves Júnior**, do Laboratório de Plasma Aplicado na Agricultura, Saúde e Meio Ambiente da UFRSA. Obrigada por seu apoio, suas conversas científicas dentro e fora da academia [caronas são um ambiente propício para aprender]. Minha eterna gratidão por me permitir trabalhar com sua equipe, e fazer parte dessa grande família chamada LabPlasma.

Agradeço ao Professor Doutor, **Hugo Alexandre Rocha**, do Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Muito obrigada por seus ensinamentos e por todos aqueles “minutinhos” do seu dia que resolviam todos os meus problemas. Saiba que cada minuto, daqueles curtos encontros, era mais valioso do que longas e improdutivas reuniões. Obrigada por me acolher em seu laboratório e me socorrer, mesmo a distância. Com você aprendi que devemos sorrir mesmo diante dos problemas diários e que chocolate é o melhor carboidrato, *ever*.

Agradeço ao Professor Doutor, **Carlos Augusto Galvão Barboza**, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Obrigada por confiar no meu trabalho e sempre me apoiar, desde os tempos de especialização. Um grande mestre que se fez amigo. Deus o abençoe sempre! O sentimento de gratidão está aqui, em meu coração, por tudo que o senhor fez por (nosso) trabalho.

Agradeço ao Professor Doutor, **Nelson Barrera**, da Pontificia Universidad Católica do Chile por aceitar ser meu orientador e ser nosso parceiro. Além da vida acadêmica sobre microscopia de força atômica, eu agradeço a solidariedade, a acolhida e os ensinamentos.

Agradeço a Professora Doutora, **Ana Katarina Menezes**, sim você é mais que uma técnica de laboratório: você é uma amiga, uma mãe e uma professora da vida. Eu sou grata por cada sorriso, cada alegria e cada “puxão de orelha” que você me deu. Você é responsável por essa doutora aqui, viu?

Agradeço a Professora Doutora, **Eneida de Paula**, da Universidade Estadual de Campinas pela generosidade com as análises de microscopia de força atômica do titânio.

Agradeço a Professora Doutora, **Helena Nader**, da Universidade Federal de São Paulo por conceder as células endoteliais da aorta do coelho (RAEC) de significativa importância para esse trabalho.

Agradeço aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**, cada um (a sua maneira) contribuiu para a minha formação profissional. Muito obrigada por compartilharem suas experiências, foi uma honra ter-los como mentores.

Agradeço as professoras, **Naisandra Silva e Naianne Clebis**, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelos ensinamentos e o apoio tanto na vida profissional como pessoal.

Agradeço aos amigos (alunos de iniciação científica), **Gabriel Moura Martins e Patrícia “Pacosi”**. Por questões meramente burocráticas não é possível escrever os co-autores nos pré-textos. Mas aqui vocês possuem o devido crédito, tenho eterna gratidão por ter a honra de trabalhar com vocês. Não pensem que eu ensinei muito, porque os verdadeiros professores foram vocês: ensinar a ensinar é uma ciência prática e dinâmica. Obrigada por me permitirem viver isso, aos meus queridos mestres mirins, muito obrigada. Vocês são parte dessa tese.

Agradeço aos amigos do Grupo de Pesquisa e Inovação em Estudos Morfofuncionais (GPIEM - UFERSA), **Luã Macedo, Khelven Lemos, Luana, Ryshely Borges, Kleydson Sena, Alan, Isaú Dantas, André Medeiros e Marcela Magalhães**, por toda a ajuda. Vocês são a prova fiel de que fazer ciência envolve respeito, amizade e muito carinho independente da área que cada um escolheu. O melhor para mim é quando eu faço o melhor para o grupo.

Agradeço aos amigos do LabPlasma UFERSA em especial a, **Jussier Vitoriano e Danilo Braz**. Quem diria que um engenheiro, um físico e uma bióloga (de salto) iriam ser grandes colaboradores, além da vida científica. Muito obrigada por cada ensinamento, por cada minuto corrido de vocês, esse trabalho também é de vocês. Gratidão eterna!

Agradeço aos amigos da cultura de células, **Vladimir Sabino, Sara Ester, Wogenes Nunes, Rômulo de Carvalho, Juliana, Verônica, Jefferson**. Aprendi muito com cada um de vocês, cresci junto com vocês e claro: Ri muito com todos vocês. Muito obrigada pela ajuda, pelo carinho e pelo apoio. Que Deus abençoe cada projeto, sonho e caminho que vocês tiverem.

Agradeço a querida **Carla Costa**, técnica do Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais da UFRN por sua paciência e gentileza para me ensinar a usar o microscópio de força atômica. Uma grande profissional sou grata a Deus por ter me permitido conhecê-la.

Agradeço aos amigos da Escola Avançada de Biofísica da FAPESP, **Juliana Damasceno, Gustavo Henrique Silva, Juan Albano e Ohana Menezes**. Em apenas 15 dias

eu construí uma nova família de paulistas, com um *hermano* argentino e uma paraibana invocada. Obrigada por me ajudarem, pelas alianças e futuros trabalhos juntos, sempre.

Agradeço aos amigos da Pontificia Universidad Católica do Chile, **Nicole Morales, Pamela Naulin, Christian Fuentes, José Cordero, Benjamin e Paola**, muito obrigada por me acolherem e me ajudarem com os experimentos, com o espanhol. Obrigada por me apresentarem o país de vocês e a cultura do Chile. *Extraño ustedes todos los días. Muchas gracias por todo mis amigos.*

Agradeço aos amigos e professores da Universidade de São Paulo, em especial ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, Rosileia Campos, Antônio Lisboa Neto, Ingrid Gomes, Jéssica Orlandin, Natália Gonçalves, Alessandra Pinheiro, Kely Robalo, Vanessa Oliveira, Valéria Lara, Fábio Cury, Luciana Machado, Anna Alencar, Érika Rondon, Amilton Santos e Diego Carvalho** pelo apoio e amizade durante esse primeiro ciclo como doutoranda.

Agradeço aos meus amigos de graduação e família, **Joyce Celestino, Isabele Aragão, Cibelle Dantas e Yuri Melo**, ninguém solta a mão de ninguém desde os tempos da graduação. Vocês são um pilar importante na minha vida.

Agradeço aos meus amigos que a vida de comunicadora do “Bióloga de Salto” me deu em especial, a **Roberta Pimenta, Ohara Oliveira, Simone Silva, Edyana Barbalho, Tainan Cruz, Mateus Rocha, Mariana Avelino, Luana Rego, Lúcia Pace, Renata Passos, Rener Oliveira e Gleidva Dantas** poderia publicar um release com agradecimentos para dizer que cada chafurdo com vocês foi relevante. Obrigada por incentivarem uma cientista no mundo da informação [divulgação científica].

Agradeço as minhas amigas biólogas, **Julliane Araújo Melo e Maria Cecília Santos**, por cada conversa, cada incentivo para finalizar essa jornada. São grandes mulheres e profissionais, uma grande inspiração para mim.

Agradeço aos colegas de doutorado, em especial a **Tiago Teófilo, Viviane Morlanes, Fernanda, Luana de Araújo, Erika, Valéria Santos, Samara Sandy, Henrique Nogueira, Alana Azevedo, Camila Gurgel, Caio, Ilanna Pristo e Werona** muito obrigada pela amizade de vocês. A cada disciplina concluída era uma grande alegria junto com vocês.

Agradeço a **CAPES**, pela concessão de bolsa de doutorado.

“Precisamos usar nossa inteligência, esforço e criatividade para sermos competitivos diante de quem tem recursos.”
Carlos Eduardo Bezerra de Moura (26 de maio de 2017)

BRAZ, Janine Karla França da Silva. **Caracterização morfológica e funcional das células endoteliais de coelho e humanas cultivadas sobre superfícies metálicas tratadas a plasma**. 2019. 105f. Tese (Doutorado em Ciência Animal: Morfofisiologia e biotecnologia animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2019.

RESUMO

Os *stents* são estruturas metálicas utilizadas em isquemias cardiovasculares. Em geral são utilizados em associação com fármacos antiplaquetários a fim de evitar a formação de trombos. Contudo, a eficácia da endotelização sobre a superfície é reduzida e aumenta o risco de restenose nos pacientes. Por isso, existe uma busca por tratamentos que modifiquem as propriedades químicas e físicas de superfícies metálicas para melhorar a integração célula-material sem a utilização de drogas antiplaquetárias. O tratamento por plasma faz modificações nanométricas e melhora a adesão, proliferação e diferenciação celular em metais, como o titânio e o aço inoxidável. O titânio é um metal inerte, resistente à corrosão, muito aplicado na produção de implantes e comumente utilizado na forma de liga com o níquel na fabricação de *stents*. Já o aço inoxidável 316L é muito utilizado na área biomédica por possuir boa resistência mecânica, contudo o desgaste por corrosão pode promover efeitos tóxicos no paciente. Os *stents* metálicos são testados comumente no modelo *in vivo* da artéria ilíaca do coelho, todavia a utilização de células endoteliais do coelho para testes *in vitro* de superfícies metálicas é insípida. Os testes *in vitro* podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de interação e integração entre as células e a superfície metálica. Apesar disso não há informações sobre esse aspecto, bem como a cerca das propriedades mecânicas das células provocadas por metais, e das possíveis implicações decorrentes dessa interação. Considerando que a utilização de modelos *in vitro* é útil na compreensão dos mecanismos de interação entre as células e as superfícies de adesão, esse trabalho avaliou o efeito da modificação de superfícies metálicas sobre as de células endoteliais humanas e de animais. Para tanto, foram produzidas superfícies de titânio nitretada e oxidada e de aço inoxidável nitretada com rugosidade nanométrica. Em seguida, estas foram caracterizadas quanto à molhabilidade pelo método de gota sésil, rugosidade por microscopia de força atômica e composição química por difração de raios-X. As células endoteliais cultivadas sobre as superfícies foram avaliadas quanto à morfologia, adesão e viabilidade. Bem como a influência na modificação das propriedades mecânicas das células endoteliais vivas sobre as superfícies de titânio tratadas a plasma por microscopia de força atômica (AFM). Com base nos métodos utilizados é possível afirmar que as modificações da superfície foram promoveram uma melhora na integração célula-superfície. As células endoteliais do coelho obtiveram melhores resultados sobre a superfície nitretada do aço inoxidável quando comparada ao titânio nitretado. As células humanas e do coelho se comportaram de forma semelhante, quanto a adesão e viabilidade celular sobre a superfície de titânio oxidada a plasma. As propriedades elásticas sofrem influência da superfície tratada a plasma e isso pode auxiliar na aplicabilidade do biomaterial a fim de utilizá-la como uma terapia inovadora como ferramenta para avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais, com futura utilização em *stents* metálicos.

Palavras-chave: Biomaterial, cardiovascular, plasma, *stent*, viscoelasticidade.

ABSTRACT

Stents are metal structures used in cardiovascular ischemia. They are generally used in combination with antiplatelet drugs to prevent thrombus formation. However, the efficacy of endothelialization on the surface is reduced and increases the risk of restenosis in patients. Therefore, there is a search for treatments that modify the chemical and physical properties of metal surfaces to improve cell-material integration without the use of antiplatelet drugs. Plasma treatment makes nanometric modifications and improves cell adhesion, proliferation, and differentiation in metals, such as titanium and stainless steel. Titanium is an inert, corrosion-resistant metal, widely applied in the production of implants and commonly used in the form of alloys with nickel in the manufacture of stents. However 316L stainless steel is widely used in the biomedical area because it has good mechanical resistance; however, wear and tear can promote toxic effects on the patient. Metal stents are commonly tested in the in vivo model of the rabbit iliac artery, however, the use of rabbit endothelial cells for in vitro testing of metal surfaces is tasteless. In vitro tests may aid in understanding the mechanisms of interaction and integration between cells and the metal surface. In spite of this, there is no information about this aspect, as well as about the mechanical properties of the cells provoked by metals, and of the possible implications resulting from this interaction. Considering that the use of in vitro models is useful in understanding the mechanisms of interaction between cells and adhesion surfaces, this work evaluated the effect of metal surface modification on human and animal endothelial cells. For this, surfaces of nitrided and oxidized titanium and nitrided stainless steel with nanoscale roughness were produced. Then, these were characterized as wettability by the sessile gout method, roughness by atomic force microscopy and chemical composition by X-ray diffraction. Endothelial cells cultured on the surfaces were evaluated for morphology, adhesion, and viability. As well as the influence on the modification of the mechanical properties of the living endothelial cells on the plasma treated titanium surfaces by atomic force microscopy (AFM). Based on the methods used it is possible to affirm that the surface modifications promoted an improvement in the cell-surface integration. The rabbit endothelial cells obtained better results on the nitrided surface of the stainless steel when compared to the nitrided titanium. Human and rabbit cells behaved similarly for cell adhesion and viability on the surface of plasma oxidized titanium. The elastic properties are influenced by the plasma treated surface and this may aid in the applicability of the biomaterial in order to use it as an innovative therapy as a tool to evaluate the biocompatibility of the biomaterials with future use in metallic stents.

Key words: Biomaterial, cardiovascular, plasma, stent, viscoelasticity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microscópio de força atômica. (A) Proteção acústica do microscópio. (B) Microscópio sobre a mesa anti-vibratória.	30
Figura 2 - Células endoteliais da aorta do coelho (RAEC) sobre superfícies de titânio nitretada a plasma. (A) Microscopia eletrônica de força atômica de RAEC cultivada sobre titânio nitretada. (B) Curva de força-indentação da periferia celular. (C) Curva de força-indentação do núcleo. (Fonte: Autora).....	31
Figura 3 - Delineamento experimental da pesquisa.....	32
Figura 4 - Aparato experimental do Laboratório de Processamento de Plasma de Materiais a plasma utilizado para o tratamento das superfícies de Ti. A – Câmara hermética. B. Detalhe do cátodo planar (→) da câmara hermética.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
ATCC	American Type Culture Collection
Ar	Argônio
CE	Célula Endotelial
CO ₂	Dióxido de Carbono
ddp	Diferença de Potencial
DEIV	Detergente enzimático
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Ea.hy926	Célula endotelial híbrida humana
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FF	Fator forma
FeTiO ₃	Ilmenita, óxido de titânio-ferro
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
L	Litro
M	Molar
mbar	Milésimos de bar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	Milílitro
mm	Milímetro
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide
min	Minutos
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
nm	Nanometro
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Solução salina tamponada
pH	Potencial hidrogeniônico
Ra	Rugosidade média

RAEC	Célula endotelial da aorta do coelho
Rp	Altura máxima do perfil de pico
Rv	Altura máxima do perfil do vale
Rz	Altura máxima média do perfil
SiC	Carbeto de sílica
SFB	Soro fetal bovino
Ti	Titânio
Ti-CP	Titânio comercialmente puro
Ti-Ni	Liga de titânio-nitrogênio
Ti-O ₂	Óxido de titânio

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Celsius
β	Beta
Δ	Delta
%	Porcentagem
π	Pi
μ	Micron

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	SUPERFÍCIE DE TITÂNIO.....	22
3.2	SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL.....	23
3.3	BIOCOMPATIBILIDADE DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO E AÇO INOXIDÁVEL	24
3.4	PLASMA E AS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO E AÇO INOXIDÁVEL	25
3.5	CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	26
3.6	INTERAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS SOBRE A SUPERFÍCIE METÁLICA	28
3.7	PROPRIEDADES MECÂNICAS DA CÉLULA.....	29
4	METODOLOGIA	32
4.1	PREPARAÇÃO DOS DISCOS	32
4.1.1	Caracterização das superfícies	33
4.2	CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS (EA.HY926)	34
4.3	CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA AORTA DE COELHO (RAECS)....	34
4.4	MORFOLOGIA E ADESÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS (EA.HY926) E CÉLULAS ENDOTELIAIS DA AORTA DE COELHO (RAECS).....	34
4.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	35
4.5	VIABILIDADE DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS (EA.HY926) E CÉLULAS ENDOTELIAIS DA AORTA DE COELHO (RAECS)	35
4.6	ENSAIO DE APOPTOSE	35
4.7	PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CÉLULAS VIVAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM) - CHILE.....	36
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
	CAPÍTULO 01 – REVISÃO DE <i>STENTS</i> DE SUPERFÍCIE METÁLICA: VALIDAÇÃO BIOLÓGICA USANDO MODELO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	38
	<i>IN VITRO</i>	38
	CAPÍTULO 02 – NITRETAÇÃO A PLASMA DO AÇO INOXIDÁVEL 316L.....	65

SOB BAIXA TEMPERATURA MELHORA A BIOCAMPATIBILIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS	65
CAPÍTULO 03 – VISCOELASTICIDADE DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS VIVAS SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO TRATADAS A PLASMA	66
CAPÍTULO 04 – COMPORTAMENTO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS <i>IN VITRO</i> SOBRE SUPERFÍCIES TITÂNIO TRATADAS A PLASMA	84
REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

Os *stents* são estruturas tubulares em forma de malha, associadas ou não a fármacos. Essas estruturas objetivam manter a integralidade morfológica e funcional dos vasos sanguíneos (LOBATO, 2006; SAKAMOTO et al., 2018). O uso terapêutico dos *stents* é recomendado para intervenção em isquemias cardiovasculares e na doença arterial coronariana, decorrente da oclusão das artérias coronárias com formação de ateromas, e na prevenção do infarto agudo do miocárdio (BRATS, 2009). Essas patologias cardiovasculares foram responsáveis por mais de 18 milhões de óbitos por ano, aproximadamente (ROTH et al, 2017). No Brasil, entre os anos de 2000 a 2005, foram utilizados 10.426 *stents* em intervenções coronárias percutâneas, e a perspectiva é de aumentar a utilização desse dispositivo pelo Sistema de Saúde do Brasil e de outros países, nos próximos anos (CARDOSO et al, 2007; BRATS, 2009).

A disponibilidade comercial de *stents* é, principalmente, na forma de *stents* farmacológicos (*stent* de superfície metálica, ou não recoberto, por polímero associado a um fármaco, como paclitaxel e sirolimo) e *stents* metálicos (endopróteses vasculares que reduzem a contração imediata da parede vascular) (GRECH, 2003). Os *stents* metálicos são confeccionados principalmente utilizando aço inoxidável 304 SS, 316L SS, tântalo, elgiloy (SS), platina, liga de cobalto e nitinol (NELKEN E SCHNEIDER, 2004). O Nitinol é uma liga metálica formada por titânio e níquel (NiTi). Apesar de ser muito utilizado, há relatos de biotoxicidade do NiTi, com efeito inflamatório decorrente da liberação de íons por falhas estruturais dos *stents* (WATAHA et al., 1999). Esse efeito pode ser evitado com a utilização de titânio associado a nitrogênio e oxigênio, por exemplo. A superfície inerte de TiO₂ (Óxido de Titânio) é espontaneamente formada e apresenta biocompatibilidade.

Apesar dos bons resultados, o uso de *stents* metálicos em patologias vasculares periféricas pode desencadear a restenose, hiperplasia epitelial inflamatória que promove o fechamento do vaso (FRANÇA e PEREIRA, 2008). A hiperplasia epitelial começa após o procedimento percutâneo do *stent*, substituindo a fisiologia normal da monocamada epitelial (endotélio vascular) por inúmeras subcamadas endoteliais. Dessa forma, alguns *stents* estão associados a fármacos antiplaquetários que inibem a agregação plaquetária, apesar de reduzirem a eficiência da endotelização.

Segundo Khademhosseini e Langer (2016), um dos grandes desafios para o avanço da bioengenharia é a falta de biomateriais adequados que possuam composição química, mecânica e propriedades biológicas adequadas. Embora o aço inoxidável seja o

primeiro material utilizado para implantes, o titânio é considerado um dos biomateriais mais recomendados para aplicações biomédicas, como por exemplo, em bombas e dispositivos cardíacos (NIINOMI, 2002; ALVES Jr. et al., 2006; GORRIERI et al., 2006). Isso porque o aço inoxidável quando em contato com os fluidos corporais ocorre redução da sua resistência a corrosão o que pode ocasionar a liberação de elementos químicos no paciente. Já o titânio tem propriedades como a biocompatibilidade, dureza e resistência à corrosão que lhe confere a qualidade da aplicação do biomaterial. Além dessas propriedades, a rugosidade e a molhabilidade da superfície são importantes para integração celular. O processamento a plasma das superfícies é um método conhecido há mais de 20 anos para modificar essas propriedades (ALVES Jr, 2001). Além disso, a técnica é considerada segura com ausência de produtos químicos e poluentes ao meio ambiente e sua utilização é de baixo custo (MOLITOR et al., 2001; SANTOS et al., 2018). Embora existam relatos que superfícies de titânio tratadas com plasma em atmosfera de oxigênio e nitrogênio apresentaram propriedades físico-químicas que melhoraram a biocompatibilidade de implantes ósseos e dentários (MOLITOR et al., 2001; MOURA et al., 2016; MOURA et al., 2019), na literatura não há relatos interação entre as superfícies de titânio nitretado e oxidado tratado com plasma com as células endoteliais, bem como das implicações do aço inoxidável nitretado a plasma sobre essas células.

As células endoteliais (CE) são as responsáveis pela homeostasia vascular, angiogênese e reparo tecidual (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2006). A interação dessas células com a superfície de titânio pode desencadear a ativação de proteínas de adesão celular, como as integrinas (SANTOS et al., 2007). O estudo pré-clínico em modelo animal é uma forma de avaliar os dispositivos endovasculares, sendo a artéria ilíaca do coelho um dos modelos mais aceitos para compreender a dinâmica dos *stents* (SCHWARTZ et al, 2008; YAZDANI et al, 2013). No coelho é observado o rápido processo de reendotelização e reparação vascular das artérias de forma semelhante aos humanos (FINN et al., 2007). Apesar disso, as células endoteliais do coelho não são utilizadas para compreender a resposta fisiológica sobre as superfícies metálicas *in vitro*. Dessa forma, torna-se relevante estabelecer uma relação entre a reendotelização *in vivo* e *in vitro*, a fim de que possam auxiliar na compreensão da homeostasia cardiovascular, das patologias vasculares e estimular a busca do modelo ideal para o estudo de biomateriais aplicados *stents* metálicos.

Esse trabalho é de grande importância, visto que um dos grandes problemas após a utilização de *stents* é a restenose vascular, com trombose tardia que causa a injúria das células endoteliais. Assim, o estabelecimento de novas ferramentas é fundamental para

acompanhar a resposta a nível celular ao biomaterial. Uma dessas ferramentas é a microscopia de força atômica (AFM- *Atomic Force Microscopy*) que tem sido utilizada para caracterizar a estrutura molecular de biomateriais e na quantificação de propriedades nanomecânicas (CÁRDENAS-PÉREZ et al., 2019). Segundo Guedes et al (2016) a quantificação da rigidez da membrana dos eritrócitos por microscopia de força atômica é uma promissora ferramenta no nanodiagnóstico de doenças cardiovasculares. Assim como a rigidez, a viscoelasticidade é uma propriedade mecânica que pode ser quantificada através das curvas de força obtidas por microscopia de força atômica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) e pode ser uma importante ferramenta para caracterizar a influência de superfícies metálicas na resposta das células endoteliais. Dessa forma, esse trabalho é uma proposta de tecnologia inovadora com aplicação na saúde cardiovascular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a morfologia, adesão, proliferação e de propriedades mecânicas das células endoteliais humanas e da aorta de coelhos cultivadas em superfícies metálicas modificadas a plasma em atmosfera de nitrogênio e oxigênio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Produzir superfícies metálicas nitretada e oxidada com rugosidade nanométrica;

2.2.2 Caracterizar as superfícies metálicas nitretada e oxidada, quanto à molhabilidade e rugosidade e composição química;

2.2.3 Avaliar a morfologia, adesão e viabilidade das células endoteliais humanas e células endoteliais da aorta de coelho (RAEC) cultivadas em superfícies nitretadas e oxidadas;

2.2.4 Estabelecer uma relação comparativa entre as células endoteliais humanas e as células endoteliais da aorta do coelho (RAEC) sobre as superfícies;

2.2.5 Caracterizar a modificação da viscoelasticidade das linhagens de células endoteliais sobre as superfícies metálicas tratadas a plasma.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SUPERFÍCIE DE TITÂNIO

Descoberto pelo químico inglês William Gregor em 1791, o elemento químico denominado de menacanita foi encontrado nas areias escuras da Cornualha (Inglaterra) ricas em ilmenita (FeTiO_3) (TRENGOVE, 1972). Posteriormente o alemão Klaproth renomeou o elemento de titânio, encontrado a partir do rutilo (TiO_2). As propriedades químicas e físicas do elemento químico titânio são estudadas desde o início do século XX. Nesse período o titânio contribuiu para a ascensão da indústria metalúrgica, principalmente, durante a Segunda Guerra Mundial (BEDER e PLOGER, 1952).

O titânio é um dos elementos químicos de transição da tabela periódica (Grupo IV e do quarto período), com número atômico 22 e número de massa 47,9. Em virtude da distribuição eletrônica $[\text{Ar}] 3d^2 4s^2$, o mesmo interage com facilidade com o hidrogênio, carbono, nitrogênio e, principalmente, o oxigênio. A ligação com o oxigênio promove a formação da camada nanométrica natural de óxido sobre a superfície do titânio. Isso garante maior estabilidade química. A estrutura cristalina do titânio pode variar conforme a temperatura. Em temperatura ambiente o titânio apresenta-se na fase α com estrutura hexagonal compacta. Já em temperaturas superiores a $882,5^\circ\text{C}$ entra na fase β , uma estrutura cúbica de corpo centrado. Na fase β , o titânio pode ser manipulado a temperatura ambiente através da adição de elementos químicos formadores de ligas (LIU et al., 2004).

Os elementos que formam ligas com o titânio podem alterar suas propriedades químicas. O carbono, nitrogênio e o oxigênio atuam estabilizando a fase α , elevando a temperatura para a transição para a fase β . Já o hidrogênio atua na estabilidade da fase β , através da redução da temperatura de transição. Outros elementos, como o silício, alumínio e o cromo podem alterar o limite de resistência a tração e a tenacidade. O zircônio potencializa a resistência ao calor e a corrosão (ZHECHEVA et al., 2005).

Apesar do seu alto grau de pureza, entre 98-99,5%, o titânio em sua forma comercial pura (Ti-cp ou TiCP) possui elementos químicos como oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, carbono e ferro (ALBREKTSSON, 1983). O titânio associado ao oxigênio (TiO_2) forma uma camada semicondutora sobre a superfície que previne a troca de elétrons e confere alta estabilidade, sendo muito utilizado, dentre outras aplicações, em nanomateriais, células solares e como biomaterial (LANDMAN et al., 2012; WU et al., 2019).

Outra forma de associação é a formação de nitretos, que consiste em ligações metálicas entre os átomos de titânio (Ti-Ti) e ligações do tipo covalente entre titânio e nitrogênio (Ti-N). Esse tipo de liga possui elevado ponto de fusão, alta dureza e faz parte do grupo dos supercondutores (ALVES JÚNIOR et al., 2019). Em virtude de suas propriedades, esse composto é amplamente utilizado para modificar as propriedades da superfície do titânio (dureza e resistência a abrasão). Dessa forma, aumenta a durabilidade dos produtos derivados desse material (GUO et al., 2005). De acordo com Nunes e colaboradores (2003) é possível obter oxinitretos de titânio através da razão nitrogênio/oxigênio e modificar algumas propriedades da superfície.

3.2 SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL

O termo aço inoxidável é aplicado ao grupo de ligas com resistência a corrosão em ar atmosférico. A constituição desse material é baseada nos sistemas de Fe-Cr, Fe-Cr-C e Fe-Cr-Ni, bem como podem estar associados a níquel, molibdênio, manganês, nitrogênio, nióbio, titânio, cobre, silício e alumínio (LIPPOLD; KOTECHI, 2005). O desenvolvimento do aço inoxidável surgiu a partir de estudos sobre resistência a corrosão em ligas de ferro-cromo por adição de cromo em 1819, pelos britânicos Michael Faraday e James Stodart (NAHA, 2011) Em 1821, incentivado a atender uma demanda do setor industrial, o mineralogista francês Pierre Berthier observou o aumento da resistência a corrosão ácida em ligas de ferro à medida que aumentava as concentrações de cromo (1 a 5%) (PADILHA; RIOS, 2002).

A partir dessas descobertas em 1904, o cientista francês Leon Guillet, realizou pesquisas com a liga de aço-cromo, sendo considerado o primeiro a produzir o aço inoxidável e definir grupos, ainda hoje conhecidos, como ferríticos, martensíticos e austeníticos (NAHA, 2011). Assim, em 1911 na Alemanha, um pesquisador em metalurgia do Laboratório de Sheffield, foi o responsável por iniciar a Era Industrial do Aço Inoxidável. Harry Brearley em sua publicação de 1913 descreveu a alta resistência a corrosão de diversos produtos da liga composta por 12,8% de cromo e 0,24% de carbono (NAHA, 2011).

Com a redução de carbono e o aumento da concentração de cromo, ficou evidenciada a grande importância no cromo para garantir a resistência a corrosão dos aços. Visto que, o contato com o oxigênio promove a formação de um filme de óxido/hidróxido (SOUSA et al., 2016). Esse filme protetor confere aderência, impermeabilização, estabilização, e principalmente, alta resistência a corrosão do aço inoxidável (LIPPOLD; KOTECHI, 2005). A partir da sua microestrutura é possível classificar o aço inoxidável em

cinco classes: ferríticos, martensíticos, duplex ferrítico-austenítico, endurecíveis por precipitação e os austeníticos (LO et al., 2009).

O grupo dos aços inoxidáveis ferríticos são constituídos de ferro acrescidos de cromo (11-13%) e adições de molibdênio (3%) e possui baixa resistência a corrosão quando comparado aos austeníticos (SATYANARAYANA, MADHUSUDHAN, MOHANDAS, 2005). Já os martensíticos são ligas de cromo (10,5-18%), níquel (até 5%) e carbono (0,1-1,0%) que podem ser acrescidos de molibdênio, vanádio, nióbio, alumínio, cobre e titânio. Esses aços possuem boa resistência mecânica e a processos de corrosão sendo comumente utilizados em tubulações petrolíferas (McGUIRE, 2008). O duplex ferrítico-austenítico possui uma das melhores resistências a corrosão, com uma constituição baseada essencialmente de ferro, cromo e níquel é utilizado na indústria de dessalinização (HONG et al., 2011). Os endurecíveis por precipitação são formados por cromo (12-18%) e níquel (3-10%) apesar de possuir boas propriedades mecânicas esse aço inoxidável tem baixa resistência à corrosão (McGUIRE, 2008).

Já os aços inoxidáveis austeníticos são formados por ferro, cromo e níquel, podendo conter adições que modificam sua microestrutura, e conseqüentemente, suas propriedades. A alta resistência a corrosão é decorrente do alto teor de cromo (15-26%) e sua estabilidade em virtude da adição de elementos como o carbono, manganês, níquel e nitrogênio (PADILHA, RIOS, 2002; McGUIRE, 2008). Por isso, esse aço inoxidável é amplamente utilizado como biomaterial.

3.3 BIOCOMPATIBILIDADE DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO E AÇO INOXIDÁVEL

O termo biocompatibilidade por definição consensual “é a habilidade do material em executar uma resposta adequada durante uma aplicação específica” (William, 1987). Em outras palavras, um material biocompatível é aquele que tem baixa toxicidade e promove a reação com o tecido biológico, com formação de uma cápsula durante certo período pós-implantação. O aço inoxidável foi o primeiro biomaterial a ser implantado com sucesso em 1920 (NIINOMI, 2002). Neste século os estudos sobre a biocompatibilidade dos metais possuem focos específicos, como por exemplo, do aço inoxidável na redução o seu potencial de corrosão quando em contato com o tecido biológico. Já o titânio deve ser direcionado a modificações específicas da superfície. Além da utilização de superfícies de titânio sensíveis aos sinais de regeneração tecidual através da ativação de receptores celulares específicos (BRUNETTE et al., 2001).

Através dos procedimentos de avaliação padronizados da ISO 10993-1 é possível mensurar a biocompatibilidade. Dentre muitos testes biológicos preconizados para aplicação médica estão os testes de genotoxicidade, carcinogênese, toxicidade reprodutiva, citotoxicidade *in vitro* e interação sanguínea.

O titânio é considerado um metal inerte e resistente a corrosão em virtude da sua fina camada de óxido na superfície (BORDJI et al.1996). A interação celular com a superfície de titânio é motivo de investigação quanto ao seu papel na proliferação e diferenciação celular (BRUNETTE et al., 2001). O aço inoxidável austenítico por sua vez, pode promover reações alérgicas e tóxicas ao paciente quando em contato prolongado com os fluidos corporais. Isso acontece em virtude da desestabilização da camada formada por óxidos que desencadeia a corrosão por pites (forma de corrosão que com criação de orifícios na superfície metálica) e frestas (associada a presença solução estagnada, localmente, e que pode penetrar o material) (ROBERGE, 2000; NINOMI; NAKAI; HIEDA, 2012). Com isso ocorre liberação de íons de níquel, cromo e molibdênio em *stents* de aço inoxidável austenítico (KOCH et al., 2002)

Para contornar os possíveis problemas do desgaste é possível melhorar a biocompatibilidade do biomaterial por adição de grupos funcionais por plasma (SEON et al, 2015). Esses grupos funcionais alteram as propriedades da superfície, como a rugosidade, o que favorece *in vitro* o aumento da adesão e da proliferação de células viáveis, e reduz a adesão bacteriana e a resposta inflamatória (KULKARNI et al, 2014; AIRES et al., 2016).

3.4 PLASMA E AS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO E AÇO INOXIDÁVEL

Os estudos a cerca de técnicas para tratar as superfícies metálicas auxiliam na obtenção de um material com maior afinidade pelo tecido biológico. Alguns desses tratamentos consistem em aumentar a rugosidade da superfície através de métodos mecânicos. Já os métodos químicos atuam na estrutura da camada de óxido do material.

Atualmente, são descritos três métodos principais para alteração da superfície de titânio: o de aplicação de recobrimentos por diferentes métodos, geralmente utilizando hidroxiapatita, para a criação de uma superfície bioativa; o método químico com uso de ácidos, anodização ou implantação iônica, que permitem ativar a superfície por meio da alteração da camada de óxido, bem como criar rugosidade a superfície; e o método mecânico por jateamento ou usinagem que consiste no jateamento de óxidos como o óxido de titânio, alumínio e silício que aumenta a rugosidade da superfície (KAWAHARA, 1995)

Com o surgimento das inovações tecnológicas, as modificações das superfícies ficaram mais sofisticadas e refinadas. O uso de lasers, feixes de íons, feixes de elétrons e plasma são as fontes de energia que permitem a funcionalização, reestruturação química, compatibilização superficial ou a ativação das superfícies orgânicas e inorgânicas (ALVES Jr., 2001; ALVES JUNIOR et al., 2019). Segundo esse mesmo autor, a técnica com uso de plasma é a mais utilizada a nível comercial. O plasma é um estado de gás com carga elétrica neutra, constituído de moléculas, íons, elétrons livres e átomos que na condição ionizada interagem entre si e sobre a superfície do material. A inserção de uma carga no plasma provoca a movimentação das cargas livres para neutralizar qualquer campo elétrico, a blindagem elétrica (MARX et al., 2016; ALVES JÚNIOR et al., 2013).

O plasma pode ser produzido artificialmente, utilizando-se de um sistema hermético a baixa pressão submetida a uma diferença de potencial (ddp) entre dois eletrodos para acelerar os elétrons livres. Dessa forma, sob a influência de um campo elétrico os elétrons livres colidem com as partículas neutras, permitindo a transferência de energia e liberação de elétrons, desencadeando a ionização do gás (ALVES Jr. et al., 2005). A utilização do método de bombardeamento por íons argônio em cátodo planar oferece uma alternativa de modificar a topografia das superfícies sem alteração da sua forma química. Todavia, caso a alteração química seja necessária, esse método permite a substituição dos íons de argônio por nitrogênio. Logo, na presença do nitrogênio reativo ao plasma ocorrerão ligações químicas entre gás e partículas da superfície, que podem formar grupos funcionais antes de atingir a superfície tratada. Esse processo é denominado de deposição ou redeposição (ALVES Jr. et al., 2001).

Aplicação de plasma em baixas temperaturas em superfícies de aço inoxidável austenítico com incorporação do nitrogênio aumenta à resistência a corrosão (LI e BELL, 2004). Apesar de sua comprovada eficácia antibacteriana (LIN et al., 2011; NUNES et al., 2018), não há relatos dos efeitos sobre as células endoteliais, uma proposta para dispositivos intravasculares.

3.5 CÉLULAS ENDOTELIAIS

As células endoteliais (ECs) revestem internamente os vasos sanguíneos e o coração, são consideradas o epitélio pavimentoso simples (IACCARINO et al., 2004; SANTULLI et al., 2014). As ECs possuem funções diversificadas dependendo do tipo e

localização do vaso sanguíneo (CINES et al., 1998). Contudo, é possível enfatizar o seu papel no transporte de pequenas moléculas, macromoléculas, hormônios, bem como na regulação da pressão e coagulação sanguínea, adesão, migração das células inflamatórias e angiogênese (BACHETTI e MORBIDELLI, 2000). A alteração dessas células pode desencadear patologias como a formação de ateromas (PINKNEY et al., 1997), desordens sanguíneas (GALLAGHER e SUMPIO, 1997), doenças autoimunes (CINES et al., 1998) e letalidade em embriões (SURI et al., 1996).

Pesquisadores têm buscado compreender o papel do endotélio em determinadas condições fisiológicas e patológicas em modelos *in vitro* (BOUÏS et al., 2001). A primeira descrição das células endoteliais *in vitro* foi obtida a partir de capilares sinusóides hepáticos por Lewis (1921). A partir de então, a utilização de modelos *in vitro* tem facilitado a análise de diversos parâmetros celulares e fisiopatológicos. As células endoteliais provenientes da veia do cordão umbilical humano (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVECs) são as mais utilizadas (JAFFE et al., 1973). As HUVECs foram inicialmente caracterizadas pela morfologia e comportamento (MARUYAMA, 1963) e posteriormente em cultivo de longa duração (JAFFE et al., 1973).

O isolamento e cultivo das HUVECs são considerados bastante laboriosos. A morfologia dessas células é poligonal com miofilamentos, com crescimento em monocamada (MARUYAMA, 1963). Em microscopia eletrônica de transmissão o citoplasma apresenta os corpos de Weibel-Palade (0,1 μ m-0,3 μ m de comprimento), organelas citoplasmáticas em forma de haste, um importante estoque intracelular de componentes bioativos para desencadear a resposta fisiológica imediata (RONDAIJ et al., 2006). Essas células sobrevivem até a décima passagem, em média, e são mantidas na cultura por até cinco meses (JAFFE et al., 1973). Em virtude da dificuldade de manter essas células em cultura, os cientistas conseguiram criar linhagens de células endoteliais imortalizadas. Essas células sobrevivem em ambiente *in vitro*, bem como conseguem manter a integridade morfológica e expressão antigênica (BOUÏS et al., 2001).

As linhagens endoteliais imortalizadas apresentam estabilidade do cariótipo e do fenótipo. Elas estão subdivididas por sua origem: endotélio de grandes vasos, endotélio de pequenos vasos e endotélio não vascular (medula óssea) (BOUÏS et al., 2001). A linhagem amplamente utilizada e com melhor caracterização é a de células endoteliais Ea.hy926. Essa linhagem foi obtida em 1983 em função da fusão das HUVECs com a linhagem A549 de células do carcinoma pulmonar humano (EDGELL ET al., 1983). Essa linhagem tem sido bastante utilizada para ensaios de adesão celular e interação com biomateriais (ABDAL-HAY

et al., 2016; KOMOROWSKI et al., 2016). A Ea.hy926 possui crescimento inibido por contato, em virtude da redução de fatores de crescimento, expressando vWF e super expressão de ICAM-1, VCAM-1, E-selectina por estímulo de TNF- α e ausência de Il-4 e IFN- γ (TORNHILL et al., 1993).

Linhagens de células endoteliais derivadas de outros animais também foram estabelecidas, visto que mimetizam *in situ* o que acontece com as células humanas (BOUÏS et al., 2001). Linhagens imortalizadas de células endoteliais de modelo animal são provenientes da medula óssea de ratos (YAMAZAKI et al., 1996), aorta de bovino (LOKESHWAR et al., 1996), aorta de coelho (BUONASSISI e VENTER, 1976), corpo lúteo de primatas (CHRISTENSON e STOUFFER, 1996), dentre outros. Segundo Buonassisi e Venter (1976), o estabelecimento da linhagem de células endoteliais da túnica íntima da aorta do coelho foi necessário para compreender a presença de receptores de neurotransmissores e hormônios, essenciais para a comunicação e bioquímica celular. Dessa forma, a utilização de linhagens animais pode ser uma alternativa ao uso do modelo animal *in vivo* para avaliar os dispositivos intravasculares (SCHWARTZ et al, 2008; YAZDANI et al, 2013). Ademais ajuda a compreender os mecanismos celulares e moleculares relacionados com o comportamento de um determinado dispositivo endovascular testado em modelos animais.

3.6 INTERAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS SOBRE A SUPERFÍCIE METÁLICA

A inserção de um biomaterial em um organismo vivo permite o contato direto, e inicial, com as células sanguíneas. A compatibilidade do biomaterial, como o titânio, às células sanguíneas determina o sucesso do transplante (MOURA et al., 2016). Durante esse primeiro contato é desencadeada uma cascata de eventos biológicos como adesão de proteínas, ativação e adesão das plaquetas, formação da rede fibrina e deposição celular. Essa superfície do biomaterial estará recoberta por lipídios, carboidratos, íons e proteínas específicas resultantes da topografia e densidade das cargas da superfície. Logo, a superfície determinará quais moléculas serão adsorvidas, e estas por sua vez orientarão diretamente as biomoléculas no recrutamento, (proteínas de ligação específicas), proliferação e diferenciação (fatores de crescimento e citocinas) (KIESWETTWER et al., 1996).

Esses eventos são iniciais no processo de integração implante-tecido. Logo a interação celular com o biomaterial irá estimular o recrutamento e fatores de crescimento e quimiotáticos para modular a resposta celular e garantir a funcionalidade tecidual (SCHWARTZ et al., 1996). Dessa forma a resposta celular é influenciada não apenas pelos

aspectos biomecânicos do material, como também da interação bioquímica com a matriz extracelular (ZIEBART et al., 2013).

3.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS DA CÉLULA

As forças mecânicas externas estimulam fatores que desencadeiam a resposta fisiológica das células (AZELOGLU, COSTA, 2011; CARTAGENA, RAMAN, 2014). O conhecimento de que as células possuem heterogeneidade mecânica surgiu a partir do experimento qualitativo com núcleo de espermatozoides, que possuem maior rigidez quando comparada a região citoplasmática (KITE, CHAMBERS, 1912). Contudo, somente com o avanço da microscopia e das técnicas de micromanipulação foi possível constatar que há redução do módulo elástico quando há ruptura dos microtúbulos, ou seja, as fibras do citoesqueleto possuem influência direta do módulo elástico da célula (NORTHERN, 1950). Logo, mensurar as variações das propriedades elásticas de células vivas, em um ambiente mimético ao fisiológico, pode auxiliar na compreensão de processos fisiológicos como a morfogênese (MONTELL, 2008), mecanotransdução (INGBERG, 1997), migração celular (DISCHER, JANMEY, WANG, 2005), apoptose (PELLING et al., 2009) e adesão focal (BALABAN et al., 2001).

O estudo da mecabiologia celular fez uso de diversas ferramentas, contudo somente com o advento da microscopia de força atômica (AFM – *Atomic Force Microscopy*) na década de 90 foi possível quantificar com maior precisão em virtude da capacidade de medir a força local e dissipativa em escala nanométrica (BINNING et al., 1986; HOH, SCHOENENBERGER, 1994; KASAS et al., 2018). O AFM é composto por uma sonda monitora, escâner piezelétrico (posiciona a amostra em relação a sonda), o circuito de realimentação da sonda acoplados ao computador para movimentar os scanners de varredura, armazenar as curvas de força e imagens geradas pelo microscópio. Esse microscópio é mantido em caixa de proteção acústica e sobre uma mesa anti-vibratória (Figura 1A-B).

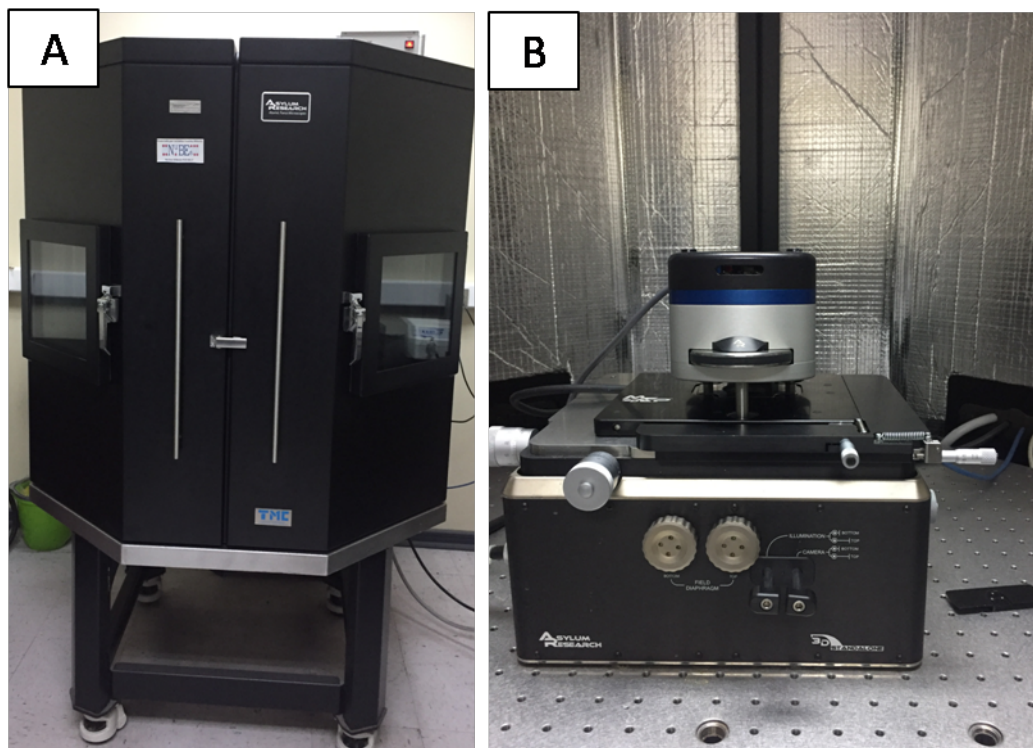


Figura 1 – Microscópio de força atômica. (A) Proteção acústica do microscópio. (B) Microscópio sobre a mesa anti-vibratória.

O funcionamento do AFM consiste na emissão de um feixe de laser sobre o cantilever, cuja movimentação será capturada por um dispositivo fotodetector. O posicionamento do *cantilever* é ajustado precisamente nos eixos x , y e z através do *scanner* piezoelétrico (3D). O cantilever possui em sua extremidade uma ponta (*tip*) e pode ser confeccionado por diversos materiais. Todavia para amostras biológicas o mais utilizado é a base de nitreto de silício com baixa constante de mola (*spring constant*). Quando a sonda interage com uma amostra rígida ocorrerá uma grande deflexão, porém se a amostra for mais viscosa a deflexão do cantilever será muito suave. Essas informações são observadas através das curvas de força geradas pelo software do AFM (Figura 2A-C). Para obter curvas de força é necessário conhecer a constante de mola, bem como escolher o formato adequado da *tip* (redonda ou piramidal), a inclinação das curvas e o ponto de contato (onde a sonda interage com a célula). Após a obtenção das curvas de força é possível quantificar a viscoelasticidade das células vivas (CARTAGENA, RAMAN, 2014; AZELOGLU, COSTA, 2011).

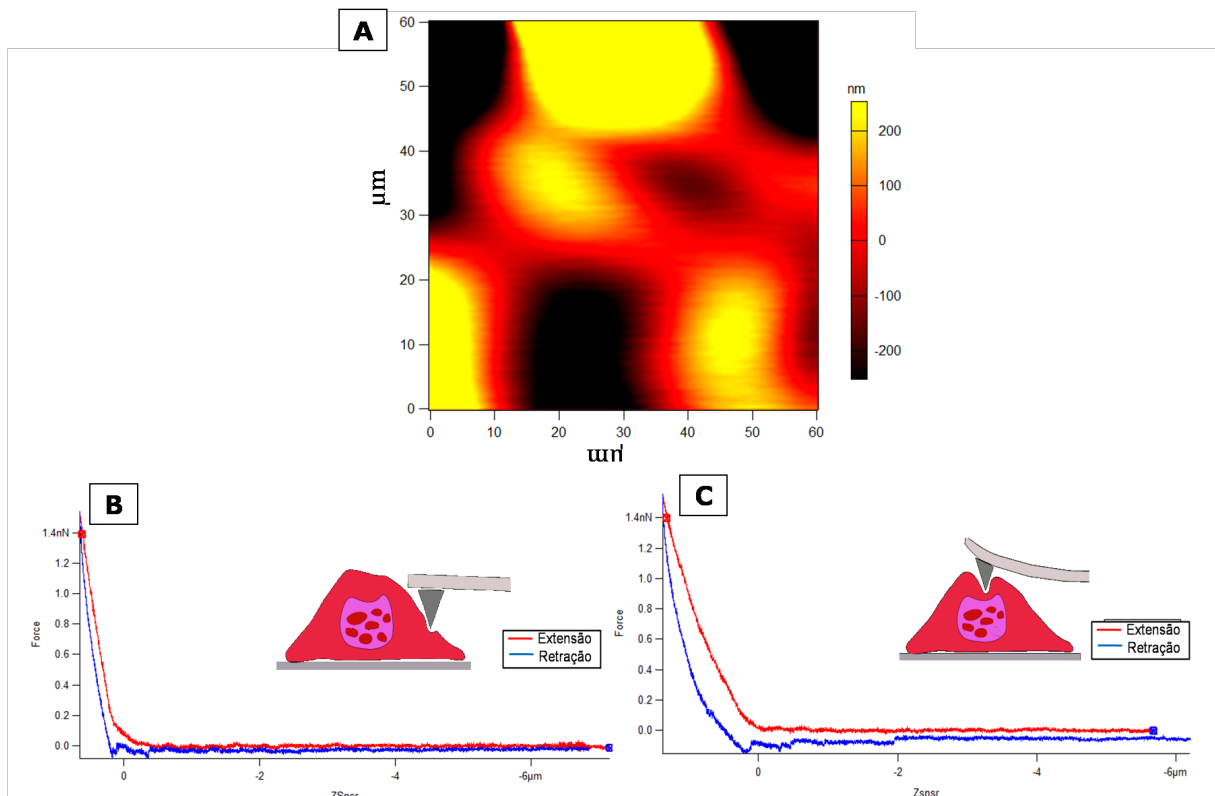


Figura 2 - Células endoteliais da aorta do coelho (RAEC) sobre superfícies de titânio nitretada a plasma. (A) Microscopia eletrônica de força atômica de RAEC cultivada sobre titânio nitretada. (B) Curva de força-indentação da periferia celular. (C) Curva de força-indentação do núcleo. (Fonte: Autora).

Dessa forma, é possível inferir que mudanças na biomecânica celular podem estar associadas a patologias como câncer (WANG et al., 2016) e doenças cardíacas (GUEDES et al., 2016). Essa é uma potencial ferramenta para o diagnóstico diferencial, bem como um biodiagnóstico de patologias. A utilização do AFM para a análise da biomecânica celular é o método mais confiável para obter informações em alta resolução, em meio líquido com material biológico vivo é um método, muitas vezes, não destrutivo. Por isso os pesquisadores têm desenvolvido métodos de análise conforme o tipo celular, bem como buscado estabelecer relações entre as propriedades mecânicas com a função desempenhada por essas células (CARTARENA-RIVERA et al., 2015; SOKOLOV e DOKUKIN et al., 2018; ZHANG et al., 2019). Assim, a utilização dessa ferramenta na avaliação da viscoelasticidade auxilia na compreensão dos mecanismos de biocompatibilidade de biomateriais metálicos.

4 METODOLOGIA

Esse trabalho utilizou as superfícies metálicas de titânio e aço inoxidável nitretada e oxidada a plasma (Figura 3). A produção dos discos de titânio foi realizada pelo Laboratório de Processamento de Materiais a Plasma da UFERSA, conforme metodologia desenvolvida por Ferraz et al. (2015). Os discos metálicos serviram de superfície para o cultivo da linhagem de células endoteliais humanas (Ea.hy926) e células endoteliais da aorta de coelho (RAECs), a fim de avaliar a resposta biológica das células em ambas as superfícies submetidas aos dois tratamentos.

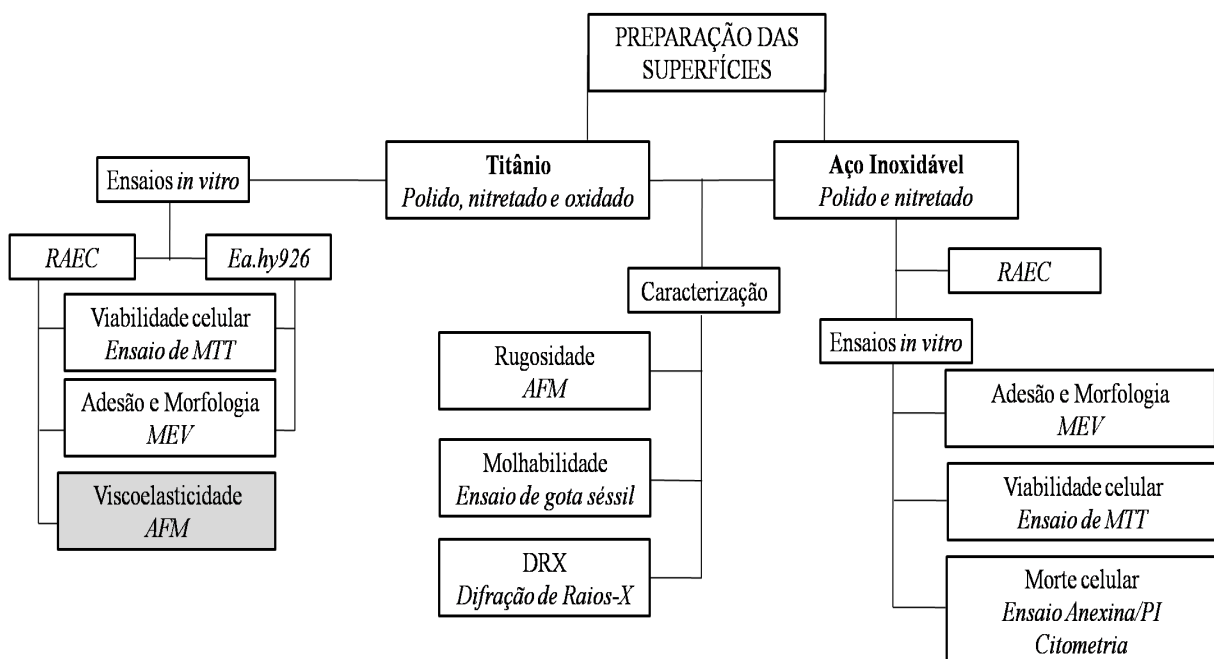


Figura 3 - Delineamento experimental da pesquisa.

4.1 PREPARAÇÃO DOS DISCOS

Foram utilizados discos de titânio (polido, nitretado e oxidado) e aço inoxidável (polido e nitretado) de dimensões pré-definidas, 19 mm de diâmetro e 3 mm de espessura, foram avaliados conforme os parâmetros molhabilidade, rugosidade e composição química para os três tratamentos. Estes foram lixados de forma gradual, com lixas de carvão de silício (SiC) de diferentes granulometrias, 220, 440, 600, 1500 e 2000 MESH e polidos em solução coloidal 40% Sílica ($0,03 \mu$) e 60% de peróxido de hidrogênio à 30% durante 30 minutos. Após esse procedimento os discos foram submetidos limpeza em ultrassom com 0,5% de detergente enzimático (DEIV) (10 min; 2 vezes), álcool 70% (10 min; 2 vezes) e água destilada (10 min; 2 vezes). Após completamente secos foram modificados por meio de

tratamento com plasma por descarga de cátodo planar em atmosfera nitretante (36N_2 e 24H_2) e oxidante (36O_2 e 24H_2), no Laboratório de Processamento de Materiais a Plasma da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA).

O tratamento das superfícies foi realizado com auxílio de um equipamento que consiste de uma câmara cilíndrica hermética de 200x300 mm (diâmetro e altura), com um ânodo (região superior) e um cátodo polarizado com uma potência que varia entre -400 e -800 V (região de base), onde os discos a serem tratados foram acondicionados (Figura 4A-B). Todos os discos foram submetidos à pressão de 1 mbar, a 450°C por 1 hora.

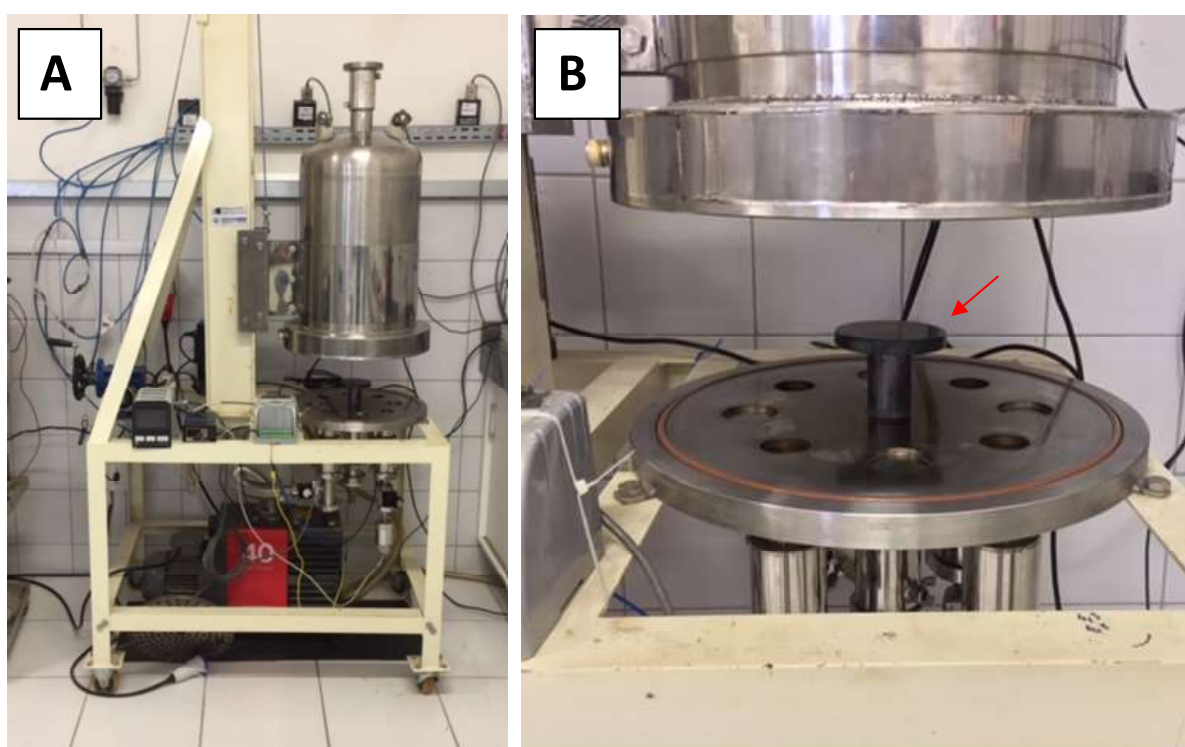


Figura 4 - Aparato experimental do Laboratório de Processamento de Plasma de Materiais a plasma utilizado para o tratamento das superfícies de Ti. A – Câmara hermética. B. Detalhe do cátodo planar (→) da câmara hermética.

4.1.1 Caracterização das superfícies

A análise de topografia das superfícies foi baseada nos parâmetros de rugosidade (R_a , R_z , R_p e R_v) obtidos utilizando Microscópio de Força Atômica (AFM, modelo SPM 9600, Shimadzu). Já a molhabilidade foi realizada pelo método de gota séssil, que consiste em mensurar o ângulo formado por uma gota de $20\ \mu\text{l}$ de água deionizada pipetada sobre as amostras (polidas, nitretadas e oxidadas), por meio da captura da imagem com câmera de

vídeo do goniômetro e, utilizando o programa Suftens (desenvolvido no LABPLASMA/UFRN) foi determinado os valores dos ângulos de contato (SÁ et al., 2009).

4.2 CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS (EA.HY926)

A linhagem das células endoteliais humanas (Ea.hy926) é estabelecida e disponível para aquisição comercial (CRL-2922™, ATCC). Logo após a aquisição, as células foram submetidas a testes de morfologia, adesão e viabilidade na superfície dos discos de titânio nitretados e oxidados.

O cultivo celular foi realizado em meio DMEM High Glucose (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) modificado para conter 4 mM de L-glutamina, 4500 mg/L de glicose, 1 mM de piruvato de sódio e 1500 mg/L de bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, SP, Brasil), 100 ul/ML de penicilina e 100 µg de estreptomicina (Cultilab, SP, Brasil) e posteriormente incubadas a 37° C em câmara de CO₂ a 5%, com troca de meio de cultura a cada 48 horas.

4.3 CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA AORTA DE COELHO (RAECS)

A linhagem de células endoteliais da aorta de coelho (RAECs) não está disponível para aquisição comercial (linhagem celular cedida pela Dra. Helena B. Nader da UNIFESP, São Paulo, Brasil). O cultivo foi em meio HAM-F12 (Gibco, Nova Iorque, Estados Unidos), suplementados com soro fetal bovino (10%), e antibióticos penicilina/estreptomicina (100 U/mL; 100 µg/mL, respectivamente). Posteriormente foram incubadas a 37° C em câmara de CO₂ a 5%, com troca de meio de cultura a cada 48 horas. Após atingirem a confluência, as RAECs foram submetidas a testes de morfologia, adesão e viabilidade nas diferentes superfícies de titânio e de aço inoxidável.

4.4 MORFOLOGIA E ADESÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS (EA.HY926) E CÉLULAS ENDOTELIAIS DA AORTA DE COELHO (RAECS)

A análise da morfologia celular sobre as superfícies foi realizada com base em protocolo descrito por Sá et al. (2009). Assim, foi utilizada a concentração de 5×10^4 células (por linhagem) sobre os discos: polidos, nitretados e oxidados e submetidas a cultivo por 4 horas em placa de 12 poços. Após esses procedimentos, as amostras foram lavadas com PBS

e fixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,2 (PBS), para posterior processamento e análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Os discos contendo células Ea.hy926 e os discos com RAECs provenientes de cada metal foram lavados com PBS, a fim de remover células não aderentes. Em seguida foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (pH 7,2), pós-fixadas com tetróxido de ósmio por 1 hora, desidratadas em concentrações crescentes de etanol e metalizadas em ouro para serem visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Após capturar as imagens da MEV, estas foram analisadas no software Image Pro Plus para fins de caracterizar a morfologia e adesão sobre a superfície de titânio e aço inoxidável. A influência da superfície nitretada e oxidada sobre as células endoteliais humanas e do coelho foram avaliadas para titânio e aço inoxidável, respectivamente, por meio do Fator Forma (FF), que consiste no produto da divisão entre área e perímetro celular: $FF = (\text{área} / \text{perímetro}^2) \times 4\pi$ (SHAH et al., 1999).

4.5 VIABILIDADE DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS (EA.HY926) E CÉLULAS ENDOTELIAIS DA AORTA DE COELHO (RAECS)

As células das duas linhagens foram cultivadas em discos de titânio, e em aço inoxidável (RAEC) e alocadas em placas de 12 poços, a concentração de 5×10^4 células/disco da Ea.hy926 e 2×10^3 células/disco da RAEC em triplicada. Após 24 horas de incubação foi adicionada em cada poço uma solução de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ao meio de cultura específico para cada linhagem por 4 horas. Os cristais de MTT foram dissolvidos após a adição de álcool etílico P.A. em cada poço e submetidos a agitação constante por 15 minutos. Uma alíquota de 100 μ l foi transferida para placas de cultura de 96 poços e quantificadas por espectrofotometria por absorvância a 570 nm em leitor de microplacas (Quant MKX200, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). A partir da curva de crescimento padrão para cada linhagem, foi quantificada a viabilidade das células nesse período.

4.6 ENSAIO DE APOPTOSE

Para a quantificação das células da RAEC em apoptose foi utilizado o Kit FITC/Annexin V Dead Cell Apoptosis with FITC Annexin e PI (Invitrogen, USA). As RAEC foram cultivadas na concentração de 2×10^3 células/disco sobre a superfície polida e nitretada de aço inoxidável durante 24h. Após esse período foi utilizado viocase para soltar as células dos discos, os poços foram lavados duas vezes em PBS gelado. Logo em seguida foi aplicado 5 μ l de anexina V-FITC e 1 μ l de iodeto de propídeo (PI) a 100 μ g/mL de PBS em temperatura ambiente por 20 minutos, protegidos da luz. A quantificação do percentual de apoptose foi determinado a cada 10.000 eventos em citômetro de fluxo (BDFacs canto II), a 530 nm e 570 nm. A análise dos dados foi realizada no software FlowJo Analysis versão 9.3.2 (Tree Star Incorporation, OR, USA).

4.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CÉLULAS VIVAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM) - CHILE

Todas as imagens das RAECs vivas foram realizadas usando AFM modo MFP-3D-Bio AFM System (Asylum Research). Utilizou-se microcantilevers Soft TR400PB (BL-TR400PB Olympus / Asylum Research) com constante de mola nominal de 0,09 N/m e raio nominal da ponta de 42 nm (\pm 12 nm). O cantilever foi montado no suporte iDrive que permite que a excitação direta da sonda seja por excitação de força de Lorentz e a constante de mola foi calibrada pelo método de flutuação de ruído termal. As imagens de AFM foram mantidas em solução Tyron em temperatura ambiente usando operação em modo contato (modo AC), tamanho 40x40 μ m e 60x60 μ m, 128x128 pixels e taxa de varredura de 0,1Hz. As propriedades viscoelásticas em modo dinâmico foram obtidas através da curva de indentação de AFM usando um modelo de viscoelasticidade Kelvin-Voigt de dois elementos (CARTAGERNA E RAMAN, 2014; CARTAGENA-RIVERA et al., 2015). As curvas de indentação foram pontuadas e analisadas no software IGOR Pro 6.37 para processamento quantitativo de dados, considerando ponto do contato o menor valor de X^2 (Qui-quadrado). As RAECs foram cultivados nos discos de titânio por 24 horas. Os discos foram lavados 2 vezes com PBS e depois plaqueados com solução Tyrode à temperatura ambiente. Um total de 32 curvas de indentação foram analisadas para cada célula ($n = 6$) tanto na região de núcleo como nas zonas periféricas.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes a morfologia e adesão das Ea.hy926 e das RAECs sobre a superfície de titânio foram avaliados pelo teste *t* de *student*. Já os resultados provenientes da proliferação e adesão foram submetidos a análise de variância ANOVA, seguida de Kruskal-Wallis. Para todas as análises será considerado $P \leq 0,05$ para indicar valores significativos.

**CAPÍTULO 01 – REVISÃO DE *STENTS* DE SUPERFÍCIE METÁLICA:
VALIDAÇÃO BIOLÓGICA USANDO MODELO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS
*IN VITRO***

Review of metal surface stents: biological validation using an *in vitro* endothelial cell model

ABSTRACT

Studies to determine effects of metal implants for humans frequently use an *in vivo* animal model. Despite this experimental model evaluating responses to an implant, it is usually only possible to elucidate physiological and molecular mechanisms of metallic biomaterials with *in vitro* experiments using animal endothelial cells. Thus, this review proposes to elucidate models of endothelial cells used to characterize and evaluate metallic biomaterials in stent manufacturing. Animal cells are able to adhere, proliferate and develop antiplatelet responses after specific treatments on metal surfaces. *In vitro* tests with an endothelial cell model provide insights into hemo-integration of metallic devices and assist in planning pre-clinical experimental designs. Thus, this review encourages studies and validation of commercially available endothelial cells, as well as creation of cryopreserved cell banks as an alternative to reduce *in vivo* assays and as primary cultures for *in vitro* testing. Moreover, we encourage creation of a standard protocol for characterizing metals subjected to surface modifications.

Keywords: Biomaterial; Endothelialization; Intravascular devices; Metallic implants.

RESUMO

Estudos para determinar os efeitos de implantes metálicos em humanos freqüentemente usam um modelo animal *in vivo*. Apesar deste modelo experimental avaliar as respostas do implante, normalmente só é possível elucidar mecanismos fisiológicos e moleculares de biomateriais metálicos com experimentos *in vitro* utilizando células endoteliais de animais. Assim, essa revisão propõe elucidar modelos de células endoteliais utilizados para caracterizar e avaliar biomateriais na fabricação de *stents*. As células de animais são capazes de aderir, proliferar e desenvolver respostas antiplaquetárias após tratamentos específicos em superfícies metálicas. Testes *in vitro* com um modelo de células endoteliais fornecem *insights* sobre a integração dos dispositivos metálicos e auxiliam no planejamento de projetos experimentais pré-clínicos. Assim, esta revisão encoraja estudos e validação de células endoteliais comercialmente disponíveis, bem como a criação de bancos de células criopreservadas como uma alternativa para reduzir ensaios *in vivo* e de culturas primárias para testes *in vitro*. Além disso, incentivamos a criação do protocolo padrão para caracterizar metais sujeitos a modificações de superfície.

Palavras-chave: Biomaterial, endotelização, dispositivos intravasculares, implantes metálicos.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases were responsible for 31% of deaths worldwide in 2015, with 7.4 million attributed to coronary pathologies¹. A common clinical intervention for such diseases is implantation of metallic stents, which began in 1986². These intravascular devices maintain vascular lumens, preserving blood flow and ensuring endothelial homeostasis³. However, metallic stents can have complications ranging from thromboembolism (accumulation of platelets that can lead to vessel compromise, including closure) up to neo-intimal hyperplasia (enlarging wall thickness of blood vessels), followed by inflammatory processes that characterize re-stenosis³. Endothelial cells (ECs) that internally coat blood vessels and hearts^{4,5} can cause various dysfunctions, including formation of atheromas⁶ and blood disorders⁷. Therefore, the greatest challenge in manufacturing metal vascular stents is identifying biomaterials with chemical functionality, as well as physical and structural properties to avoid inducing an immune response to promote rapid and efficient re-endothelialization that can prevent re-stenosis⁸. Moreover, metal applied to stents must be corrosion resistant, radio-opaque, inert, and have high elastic modulus, as well as appropriate yield and tensile strengths^{9,10}.

There are techniques to produce products with appropriate surface energy (wettability property), surface texture (roughness property), surface potential (electrical), and stability of the surface oxide layer (ionic surface material layer) to promote various biological responses *in vitro* and *in vivo*¹⁰⁻¹². Despite the huge variety of metals available in the industrial sector, common candidates for biomaterials are limited to 316L stainless steel (316L SS), titanium (Ti), nitinol (Ni-Ti), tantalum (Ta), cobalt-chromium (Co-Cr) alloy, pure iron (Fe), platinum-iridium (Pt-Ir) alloy, and magnesium (Mg) alloys (10, 13,14). Interactions of ECs with metallic surfaces of stents is the main objective of this study, with a focus on titanium, as it is considered to have excellent biocompatibility, even when associated with metallic alloys¹⁵.

Although swine and rabbits are commonly used for *in vivo* tests due to similar anatomical dimensions and physiology, respectively^{16,17}, stents should be tested and evaluated *in vitro* under conditions that mimic and simulate anatomical conditions *in vivo*¹⁸. According to a guide published by the *US Food and Drug Administration*¹⁸, cytotoxicity tests, hemocompatibility (e.g. platelet adhesion) and genotoxicity can be performed *in vitro*, thereby reducing *in vivo* tests. In addition, pre-clinical trials should establish safe and accurate protocols to reduce the need for replications, as well as use of control animals¹⁹.

Depending on the particular biomaterial, human ECs may be an inadequate model, as those cells have various origins and sometimes a particular cell does not reflect pathological conditions of patients²⁰. Although >60% of biomaterial papers have chosen *in vitro* evaluations using Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC), this may not be an ideal model, as oxygen concentrations are higher in umbilical vein endothelium than in other veins²⁰. Errors resulting from misuse of these models have been described²¹ and are an impetus to develop new animal models.

Some commercialized animal endothelial cell lines were originally derived from the bone marrow of rats²², aortas of cattle²³, pigs²⁴ and rabbits²⁵ and of horses²⁸, the corpus luteum of primates²⁶, vena cava and aorta of cats²⁷, and jugular veins of dogs²⁹, among others. Notwithstanding, studies using these cells are scarce and *in vivo* animal models are more commonly used to evaluate intravascular devices³⁰⁻³². Thus, animal cell cultures are a replacement alternative strategy to reduce the number of animals used for *in vivo* testing³³. Furthermore, they are necessary to characterize animal EC lines used in validating metallic intravascular devices, as well as for understanding which cells are more frequently used and whether they can adequately mimic behavior of human ECs on metal surfaces (Table 1). In this review, we emphasize the feasibility of using these cells and that development of a cryopreserved bank and/or immortalized cells could reduce the need for *in vivo* testing and ultimately, number of animals used.

Table 1 - Endothelial cells of animals applied in the evaluation of metallic biomaterials.

Cell Line	Biomaterial	Treatment	References
	TiCp (250 -750 nm, roughness)		
	CrCoMo (200 - 400 nm, roughness	Nanoparticles	(38); (39)
Rat aortic endothelial cells	Titanium (99.8%; T-2069)	<i>e-beam</i> evaporation	(40); (41); (43); (44)
	Titanium (99.38%; 12 mm x 0.5 mm)	Cl ₂ /Ar Plasma	(42)
	Nitinol (55.5% Ni; 44.5% Ti)	-	(45)
	Titanium (TiCP e Ti6Al4V) and nanostructured polymeric (PVC, PU, PTFE, PETG, and nylon)	Plasma (N ₂)	(48)

	Titanium (99.995%) and polyethylene	<i>e-beam</i> evaporation	(49)
	Titanium (99%)	Rosette-Nanotubes	(50)
	TiO ₂ (99.6% Ti pure)	Nanotubes	(51)
Murine Endothelial Progenitor Cells	Titanium (12 mm x 1 mm, disk dimension)	NaOH and anti-CD34 antibody	(52)
	Titanium (Ticp; 1 x 1 x 0.2 cm ³)	Aminosilanization	(53)
	Iron, Nickel and Chrome (Fe ₆₀ Ni ₁₀ Cr ₁₀ P ₁₃ C ₇)	Planar flow (0.3 atm de argon pure)	(57)
Bovine Aortic Endothelial Cells	Titanium (0.2 mm diameter; 99.9%)	Irradiation - β -particles	(58)
	Iron oxide	Nanoparticles SPION	(59)
	TiO ₂	Nanotubes - anodization	(60)
	Co-20 Cr-35 Ni-10 Mo	Plasma	(62)
	Tantalum	Anodization	(3)
Calf Pulmonary Artery Endothelial Cells	Titanium (75mm diameter)	Argon Plasma (99,99% pure) or n-hexane (99% pure)	(61)
Bovine Coronary Artery Endothelial Cells	TiO ₂ (Ti6Al4V)	Nanotubes - Anodization	(63)
Porcine Endothelial Progenitor Cells	Nitinol Stent (8.0 x 6 mm, dimension)	-	(69)
	Titanium (99,99%)	<i>e-beam</i> evaporation	(70)
	Ferromagnetic bare metal stent (10 x 3 mm, dimension)	-	(12)

	316L stainless steel, cobalt chromium alloy and platinum chromium alloy		
	Chrome / Cobalt		
	Cobalt (50.5%), Chromium (20%), Nickel (10%), Tungsten (15%), Manganese (1.5%), Iron (~3%)	Nanoparticles Oligonucleotide	(72)
<hr/>			
Porcine			
Pulmonary Artery Endothelial Cell	TiO ₂ (anatase, 44689, 99.9% pure, 5 nm)	Nanoparticles	(71)
<hr/>			
Canine			
Endothelial Cell and Endothelial Progenitor Cells	Titanium (Ticp; 8.0 mm, dimension)	Biotinylated peptide	(76)

The objective of this study was to elucidate models of endothelial cells used to characterize and evaluate metallic biomaterials in stent manufacturing. *In vitro* assays help to understand cellular and molecular mechanisms involved in biocompatibility of stents, providing key information for preventing most stent problems.

MURINE ENDOTHELIAL CELLS

ECs from mice and rats can be obtained from many sources, including large blood vessels (e.g. aorta) or cerebral microvessels, from blood or bone marrow (progenitor endothelial cells)³⁴. Despite being widely considered the best model for research³⁵, isolation of murine ECs by primary culture is costly due to vessel size, resistance to enzymatic digestion by collagenase, low number of cells per culture and high contamination rates^{36,37}. ECs from mice and rats are most commonly used for studies of metallic surfaces applied to stents. The first study in this field confirmed an increased *in vitro* response of rat aortic endothelial cells (RAEC; VEC Technologies) to nanostructured metallic surfaces of

commercially pure titanium (Ti cp; 250-750 nm) and Cobalt-Chromium-Molybdenum (CoCrMo; 200-400 nm)³⁸. Without altering chemical properties of the metal, a high degree of endothelialization was obtained by applying nanoparticles to create roughness on Ti cp and CoCrMo surfaces (11.9 ± 2.2 nm; 14.1 ± 2.5 nm, respectively), approximately 2 times more than an untreated titanium surface (4.9 ± 1.4 nm) and 5 times more than conventional CoCrMo (3.2 ± 0.2 nm). Despite these contributions to the study of metallic surfaces, it was not possible to understand how altering the metallic nanostructure optimized protein interactions to promote cell adhesion, given that the initial adsorption, conformation, and bioactivity of proteins contained in the serum acted in synergy with nanostructured titanium metal surfaces (particle size, 250-750 nm) in adhesion of RAECs³⁹.

Based on the success of the RAEC response on the first nanostructured metallic biomaterials, hypotheses regarding the influence of structural interfaces on ECs, such as meta-structures, have been created. Meta-structures are systems composed of nanometric properties (<50 nm) and submicrometric scales (>100 nm) (Figure 1A). After 4 h, cell density of RAECs increased on both submicrometric (>2500 cells/cm²; $p < 0.01$) and nanometric surfaces (> 1500 cells/cm²; $p < 0.05$) when compared to smooth or polished titanium (>1000 cells/cm²). Minimal changes in surface roughness can alter wettability (property of a fluid adhering or spreading on a solid surface) and consequently cell adhesion, ensuring endothelial cytocompatibility with surfaces⁴⁰.

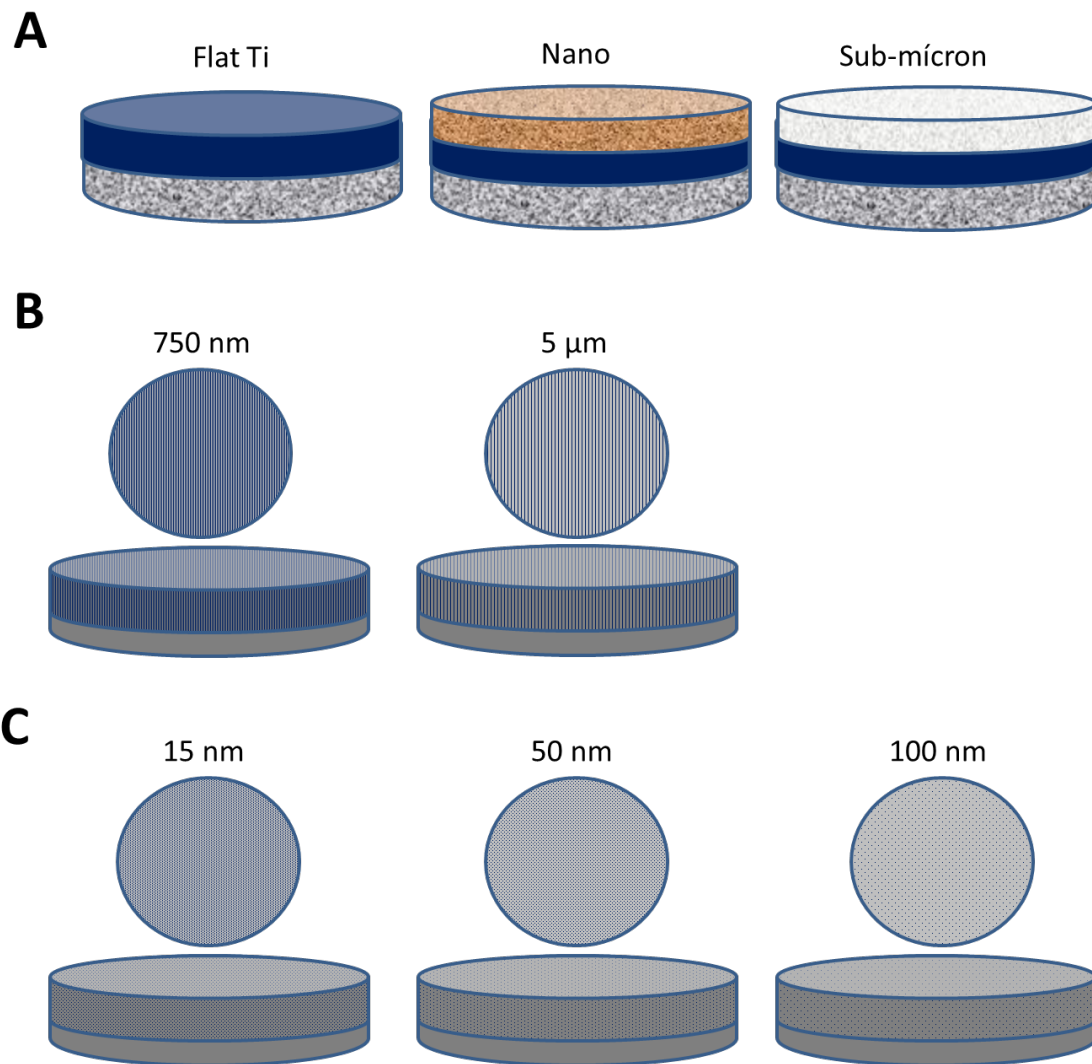


Figure 1 - Modifications of topographic properties of metal surfaces. A - Polished titanium surfaces and surfaces with nanometric (<50 nm) and submicrometric roughness (>100 nm). B - Titanium surfaces with varying roughness, nanometric (750 nm) and submicrometric roughness (5 μm). C - Titanium surfaces with nanotubes of various diameters (15, 50 and 100 nm).

Similar results were described⁴¹ using long-term RAECs on titanium nanometric and submicrometric surfaces treated by *e-beam* evaporation (20 $\text{\AA}/\text{s}$ with a current beam density of $130 \text{ mA}/\text{cm}^2$). After culture (1, 3 and 5 d) on both treated surfaces, proliferation of RAECs increased significantly compared to the polished titanium surface. However, the submicrometric scale had better results in comparing both treated surfaces, including greater spreading (horizontal expansion of the cell on a surface) of rat ECs after 24 h and establishment of a cellular monolayer in 5 d. This was due to the lower contact angle (18°) of the sessile water drop on the surface and consequently greater wettability and increased roughness due to an agglomeration of nanoparticles on the submicrometric surface.

Roughness also affected functions of this cellular type, considering that collagen synthesis ($\sim 1.6 \times 10^{-4}$; $p < 0.005$; $\sim 1 \times 10^{-4}$; $p < 0.05$) and elastin ($\sim 3.5 \times 10^{-4}$; $p < 0.05$; $\sim 2.5 \times 10^{-4}$; $p < 0.05$) were elevated for submicrometric and nanometric surfaces, respectively, compared to the control ($\sim 0.5 \times 10^{-4}$; $\sim 2.5 \times 10^{-4}$). Thus, surface topography influenced RAEC and can reduce risk of re-stenosis by promoting rapid endothelialization.

Rough titanium nanostructure is a promising surface for adhesion of endothelial cells (RAECs), from which it is possible to understand functions performed by endothelial cells on varying roughness patterns, e.g. after Cl_2/Ar plasma on titanium. Surfaces developed with nanoscale roughness had 9 sub-regions ($5 \times 5 \text{ mm}^2$) in the form of parallel lines of equal width, with spaces ranging from 750 nm to 100 μm (Figure 1B). Although adhesion of RAECs increased after 4 h on all nano-titanium surfaces, only those $< 10 \mu\text{m}$ had spread cells and were first to achieve confluence after 5 d of culture. Therefore, endothelial cell function can be improved by reducing nanoscale patterns⁴².

Although RAECs positively interacted on titanium surfaces with a submicrometric and nanometric roughness scale, it is necessary to confirm the absence of platelet adhesion, as thrombus formation is a frequent feature in vascular re-stenosis following implantation of metallic stents. The first study of platelet adhesion used swine platelets and compared them to endothelial cells (RAECs) on titanium surfaces at nanometric (1.15 ± 0.11) and submicrometric roughness scales (13.77 ± 0.83), both produced by *e-beam* evaporation. Compared to a polished surface, platelet adhesion was reduced on submicrometric (57%, $p < 0.01$) and nanometric (44%, $p < 0.01$) titanium surfaces after 30 min of contact. In addition, there was a significant difference in the thrombotic state of RAECs on various surfaces through nitric oxide targeting (NOx). NOx is a vasodilator that can act in inhibiting platelet adhesion and is constantly secreted by ECs to maintain homeostasis. RAECs increased NOx synthesis by 70% ($\sim 3 \times 10^{-5}$; $p < 0.05$) after culture on a titanium submicrometric surface when compared to a polished titanium surface ($\sim 1.5 \times 10^{-5}$). Therefore, submicrometric roughness acted positively by inhibiting thrombus formation without affecting adhesion and endothelial cell physiology⁴³.

In addition, topography of nanometric (roughness, 2 nm) and submicrometric (roughness $< 100 \text{ nm}$) titanium surfaces inhibited inflammatory responses in co-cultures with endothelial cells and macrophages of rats (IC-21 cell line), reducing pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6)³⁶. In co-culture with ECs, macrophages significantly reduced cell adhesion on the submicrometric surface of titanium when compared to polished titanium ($\sim 6 \times 10^5$ versus $\sim 7 \times 10^5$). In addition, TNF- α was reduced after 4, 12, 24 or 36 h on

both surfaces when compared to a polished surface. Furthermore, IL-6 was significantly reduced after 4 h on the submicrometric scale in relation to control, whereas IL-1 β was significantly reduced after 4 h or after 24 or 36 h on submicrometric and nanometric surfaces, respectively. Compared to the control group, all treated surfaces induced IL-1 β reduction at 12 h. Therefore, the inflammatory process on these surfaces was reduced, promoting adhesion of endothelial cells⁴⁴.

Submicrometric roughness was also obtained and characterized in nickel and titanium alloys (Nitinol, 55.5% Ni and 44.5% Ti). This metal has elastic and shape memory properties, enabling it to regain its original shape after deformation. In this case, there was increased adhesion of RAECs (~ 50 cells/mm²; $p < 0.01$) on nitinol surfaces with submicrometric roughness when compared to the control (~ 30 cells/mm²). Despite initial good results with the surface, the authors suggested conducting further studies to further validate the effectiveness of this surface⁴⁵.

The use of anti-thrombogenic drugs in association with metal stents avoids platelet adhesion; however, it also reduces endothelial cell adhesion to the surface. Therefore, modifying surface properties may improve hemocompatibility to the point of replacing these substances. One approach is ionic plasma deposition (IPD), with film formation on/within the surface of the material with molecules < 100 nm^{46,47}. This method was used for the first time to evaluate responses of endothelial cells (RAECs) on titanium surfaces treated by IPD or a nitrogen ion implantation plasma deposition (NIIPD) process. After 4 h of incubation at 3500 cells/cm² of surface area, surfaces treated by IPD stimulated a significant increase in RAEC adhesion when compared to the control group. This was probably due to the nanorugosity created by the plasma. In addition, the reduced contact angle implied increased surface wettability, favoring initial adsorption of adhesion proteins (i.e. vitronectin)⁴⁸.

Furthermore, it is possible to obtain nano-roughness of titanium and polyethylene by titanium deposition through electron evaporation. The reduced contact angle for both the titanium nano-roughness surface (59.3 ± 1.13) and the polyethylene nano-roughness surface (55.8 ± 1.64) promoted better RAEC adhesion ($\sim 3 \times 10^3$ and $\sim 3.2 \times 10^3$; $p < 0.01$) when compared to the respective control surfaces ($\sim 1.5 \times 10^3$ and $\sim 5 \times 10^2$). Thus, increased hydrophilicity of the surface promoted cell adhesion⁴⁹.

In addition to biomaterial surface modification techniques for cardiovascular applications, there is a search for an ideal design capable of eliminating the need to use anti-thrombogenic drugs in association with these devices. Rosette-nanotubes (RNTs) coat the titanium stent and were functionalized with 2 concentrations (0.01 and 0.001 mg/mL) of DNA

molecules with poly-L-lysine (Figure 2B). The RAECs had increased adhesion ($\sim 2.7 \times 10^3$ cells/cm²; $p < 0.01$) after 4 h of culture on the titanium stent, with 0.01 mg/mL RNTs coated on titanium when compared to an uncoated titanium stent ($\sim 1.9 \times 10^3$). This occurred due to the biomimetic potential of the rough surface, in addition to the stability of the poly-L-lysine linkages that optimized adhesion protein binding to cells, representing a promising stent design⁵⁰.

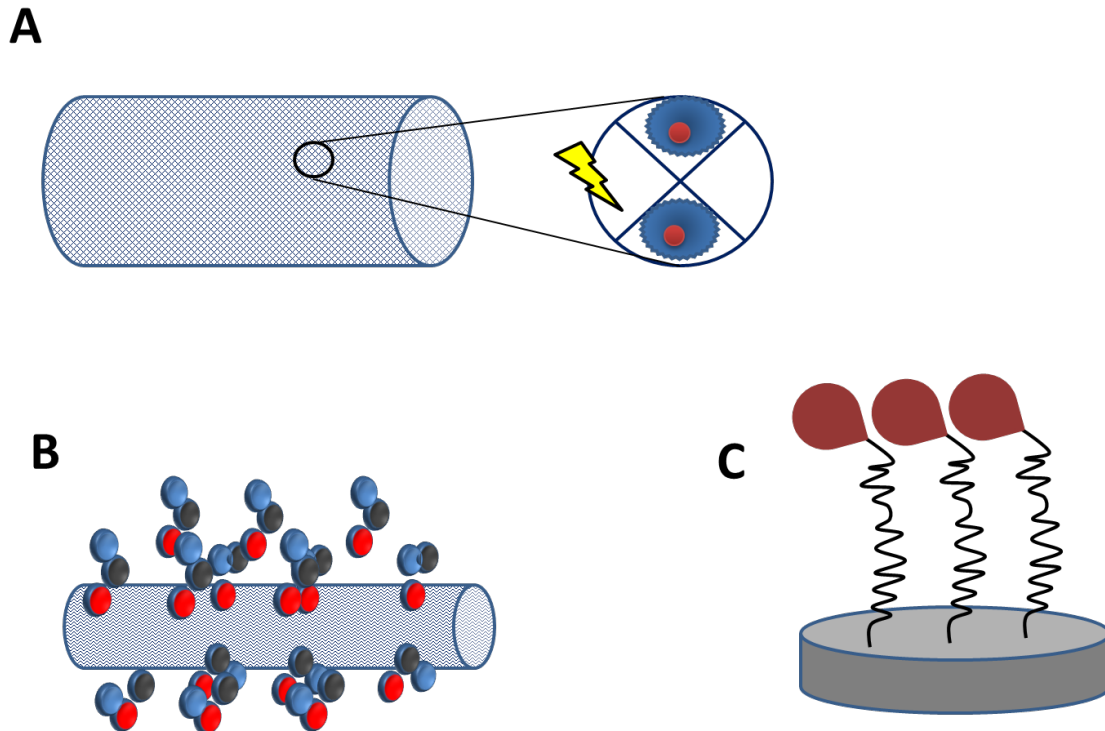


Figure 2 - Functionalization of metal surfaces. (A) New metal stent design susceptible to magnetic energy. (B) Titanium nanotube associated with DNA molecules. (C) Titanium surface bound to antibody-CD34.

Another study using nanotubes used TiO₂ surfaces to compare the influence of nanotubular diameter and the TiO₂ crystal structure (anatase *versus* amorphous) on adhesion, proliferation, differentiation, migration and apoptosis of RAECs⁵¹ (Figure 1C). Cellular response was similar between surfaces; however, there was a strong effect of nanotube diameter, regardless of the metal's crystalline structure. As nanotubular diameter decreased for both anatase and amorphous forms, proliferation and adhesion of RAECs increased after 1, 2 or 3 d. The 15-nm diameter surface had a lower rate of apoptotic cells (8.5%) when compared to the 100-nm diameter surface (36.7%). In addition, functional integrity of RAECs in the 15-nm titanium nanotubes were evaluated as positive by strong expression of Von

Willbrand factor (vWF) in both crystal structures. Thus, microenvironmental nanotopography was more important than crystalline structure for ECs, with better responses for diameters of 15-30 versus 50-100 nm.

Endothelial Progenitor Cells (EPC) can be isolated from rat blood or bone marrow. Putting anti-CD34 antibodies on the titanium surface improved mobilization and re-endothelialization of EPC on those surfaces⁵² (Figure 2C). The rounded morphology of these cells was maintained until the first hour of culture on titanium surfaces with anti-CD34 antibody. At 2 h, cells were already migrating (spread cells) and at 24 h they were spreading and proliferating on the surface, although no differences in cell adhesion were observed after the 3rd day. Thus, although endothelial and progenitor endothelial cells depend on anchoring proteins, the presence of anti-CD34 on the surface facilitated binding with the titanium surface. Even though this connection does not occur naturally, it does not affect cell morphology and migration, as antigen-antibody binding only promotes the necessary initial adhesion for the interaction, enabling it to successfully bind to the surface⁵².

Chen *et al.*⁵³ coated a chemically hydroxylated titanium surface with covalent polyethylene glycol (PEG) bonds in an attempt to promote adhesion of rat EPCs. However, hemo-compatibility varied with concentrations used. No improvement in hemocompatibility was observed on the surface of 600 concentration (PEG₆₀₀). However, there was an increase in adhered cells after 24 h ($\sim 5 \times 10^3$ cells/cm²; $p < 0.05$) at the concentration of 4000 in titanium (PEG₄₀₀₀) compared to an untreated titanium surface ($\sim 4.3 \times 10^3$ cells/cm²). Although adhesion occurred, cells did not significantly proliferate between days 3 and 5 ($\sim 1 \times 10^4$ and $\sim 8.5 \times 10^4$ cells/cm², respectively) when compared to the respective titanium control ($\sim 1.35 \times 10^4$ and $\sim 2.25 \times 10^4$ cells/cm²). This was due to flexibility of the PEG chains, which inhibited cell spreading on surfaces and deposition of extracellular matrix. Thus, the PEG titanium surface only provided a suitable stent environment after gel hydrolysis⁵³.

BOVINE ENDOTHELIAL CELLS

Similar to other animals, bovine endothelial cells can be obtained from large and small blood vessels. The first lineages of bovine aortic endothelial cells were established by Booyse *et al.*⁵⁴ by 35 passages, without no change in morphology. The authors reported that these cells had Weibel-Palade bodies, pycnotic vesicles, microfilaments, antigens for factor VIII and contractile proteins of thromboelastin in their ultrastructure. Endothelial cells were subsequently isolated from the pulmonary artery of calves⁵⁵, followed by endothelial cells of bovine capillaries⁵⁶, with an objective to study metastasis mechanisms of specific metastatic

implantation sites and tumor cell adhesion to endothelial cells of various organs. There are also endothelial cells from cerebral microvessels for *in vitro* studies of studies of nervous system vascularization³⁴.

Bovine aortic endothelial cells (BAECs) were also used in pioneering studies to demonstrate the ability of EC adhesion to metallic surfaces. Various alloys were prepared from iron, nickel and chromium. BAEC adhesion to metallic surfaces occurred 6 h after culture, with no significant differences among surfaces. Therefore, it was suggested to modify metallic composition to optimize cell proliferation and adhesion. In addition, it was not possible to determine cellular mechanisms involved in protein adsorption or cell adhesion⁵⁷.

The use of BAECs was essential to evaluate local effect of irradiation of β -particles on titanium surfaces coated with a low concentration of radioactive ^{32}P (half-life, 14.3 d). In this case, endothelial cells demonstrated resistance to the anti-proliferative effects of β -particles, which may mitigate risk of re-stenosis (58). According to Polyak *et al.* (59), there were no changes in morphology when using biodegradable superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) associated with BAECs (Figure 2A). Cells were recruited by nanoparticles after exposure to a uniform magnetic field in the flow-loop system. Thus, this approach could be used in cellular therapy in cardiovascular pathologies associated with metallic stents.

The surface of titanium nanotubes (TiO_2) prepared by anodization was also characterized in terms of its *in vitro* re-endothetization potential with BAECs. Endothelial cells were viable, proliferating and formed a cell monolayer after 24 h. On this surface, cell morphology included numerous filopodia after 2 h, indicating greater interaction between the surface and therefore cell proliferation capacity with extracellular matrix deposition (after 6 h). Moreover, no significant differences in NOx increase or endothelin-1 were observed. Thus, the 3-dimensional structure of TiO_2 nanotubes can aid in cellular migration and communication, leading to rapid re-endothelialization and cell proliferation⁶⁰.

Modification by plasma polymerization with argon (20% Ti) or with n-hexane (0.6%Ti) enabled a film to form over the titanium surface. This was characterized using calf pulmonary artery endothelial cells (CCL209, ATCC). The surface treated by argon with titanium (20%) and oxygen (11%) stimulated increased endothelial cell spreading ($\sim 1.2 \times 10^4$ cells/cm²; $p \leq 0.05$) and cell adhesion (6×10^3 μm^2 ; $p \leq 0.05$) in relation to a surface with an n-hexane deposit ($\sim 1 \times 10^4$ and $\sim 3.5 \times 10^3$ μm^2 , respectively)⁶¹.

Plasma was also used in combination with radiofrequency to modify the MP35N metallic alloy (Co-20 Cr-35 Ni-10 Mo)⁶². Plasma altered surface roughness, creating pyramid-

shaped nanopillars which increased the total contact surface ~5 fold compared to the polished surface. In addition, it reduced the contact angle from 74 to 17°, making the surface more hydrophilic. These changes mimicked what happens *in vivo* during cell adhesion and proliferation, since after BAEC cultivation on the surface, cells adhered 24 h later with a ~50-60% increase after 2 and 7 d, when compared to the polystyrene control, with monolayer formation after 3 d of culture⁶².

The positive effect of anodization in TiO₂ nanotubes (70 nm) on angiogenesis in bovine coronary artery endothelial cells (BCAECs) was recently confirmed⁶³. This surface stimulated an increase of filopodia propagation, deposition of extracellular matrix and cellular interconnections, which favored adhesion after 4 h, probably by phosphorylation of $\alpha_5\beta_3$ integrins. Thus, they stimulated angiogenesis through expression of vinculin (cell-matrix adhesion protein) via a VEGF-dependent phosphorylation pathway, with activation of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR2) after 72 h of culture.

Although titanium is the most common metal used in manufacturing metal implants, there are ongoing searches for new biomaterials for cardiovascular applications. Thus, McNichols *et al.*³ developed nanosurfaces on Tantalum metal (a chemical element belonging to the class of transition metals) through anodization. A tantalum surface associated with cyclic RGD peptides (Arg-Gly-Asp peptide, universal cell recognition site) provided good results regarding BAEC adhesion, spreading, proliferation and expression of cellular junctions.

PORCINE ENDOTHELIAL CELLS

Porcine Aortic Endothelial Cells (PAOECs) were isolated and characterized⁶⁴. Despite preserved morphology, phenotypic change occurred after the 4th passage, making *in vitro* research impossible. Thus, there is an impetus to establish porcine endothelial cell lines suitable for surviving multiple passages. Consequently, among the commercially available porcine aortic endothelial cells (P304-05, SIGMA) we highlight the PAEC11 line, which is suitable for endothelial cell activation studies⁶⁵ and the immortalized and characterized porcine aortic endothelial cell lines (AOCs) to facilitate immunological and pathological *in vitro* studies⁶⁶. Swine endothelial cells may also originate from the pulmonary arteries⁶⁷ or cerebral capillaries⁶⁸.

Studies on the isolation and characterization of porcine endothelial cells started in the 1970s. However, *in vitro* studies applied to metallic biomaterials for cardiovascular use only started in the 21st century, mainly with EPCs. These cells have a crucial role in *in vivo* re-

endothelialization and therefore they were used to confirm the positive influence of the metal stent surface on viability⁶⁹. After isolation and phenotypic characterization by CD34-positive immunostaining, EPCs adhered after 24 h and they maintained morphology on nitinol surface (NiTi) metallic stents associated with fibrin gel up to the 12th day.

The possibility of delivering progenitor endothelial cells was also studied on titanium surfaces comprised of 22% Ti, 52% O₂, 23% C, and 2% N⁷⁰. On this surface, porcine EPCs adhered and formed a confluent monolayer without altering nitric oxide (NO) synthesis. Therefore, a low-roughness surface (quadratic mean roughness, R_q = 10 nm) promoted a favorable physiological response of porcine EPCs. This may have resulted from titanium oxidation (TiO₂), which promotes strong cell adhesion to the surface.

Due to favorable results for use with oxidized titanium surfaces, metallic nanoparticles associated with cells were developed. After coating porcine EPCs with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION), recruitment of endothelial cells to metallic stents was observed *in vitro*. Therefore, this surface was biocompatible and performed cellular delivery¹⁸. However, anatase TiO₂ nanoparticles (TiO₂ NP) may activate both inflammatory and programmed cell death pathways⁷¹. The use of 10 or 50 µg/mL TiO₂ NP increased expression of inflammation genes and activated apoptosis pathways, e.g. MAPKs, Akt and NF-κβ.

Cell therapy associated with metal stents enables blood-borne EPCs to bind to the specific site by assisting in re-endothelialization. The oligonucleotide (5'-GGG AGC TCA GAA TAA ACG CTC AAC AAC CCG TCA ACG AAC CGG AGT GTG GCA GGT TCG ACA TGA GGC CCG GAT C-3') (Integrated DNA technologies, Coralville, IA, USA) associated with a chromium/cobalt surface increased adhesion of porcine EPCs and reduced platelet adhesion. This may have been due to the increased surface wettability resulting from reducing the contact angle from ~85 to ~40°⁷².

CANINE ENDOTHELIAL CELLS

Canine endothelial cells have already been isolated and characterized and are obtained from several sources: progenitor endothelial cells (EPCs) from endothelial cells from cerebral microvessels⁷³, peripheral blood⁷⁴, as well as from the canine jugular vein⁷⁵. Despite the variety of canine endothelial cells, few studies have used them for *in vitro* stent studies. The titanium surface with a biotinylated peptide (TPSLEQRTVYAK-GGGC-K-Biotin, (BPA, Botai Biotech. Co., Ltd., Xangai, China) and bovine albumin maintained the morphological integrity of EPCs and canine endothelial cells, as well as promoted adhesion. However, they

reduced platelet activation and consequently the chance of thrombus formation, improving re-endothelization⁷⁶.

FINAL CONSIDERATIONS

Various types of metals and alloys have been used for stents, with titanium being the most common. According to this review, characterization tests most frequently applied to surfaces are wettability, surface roughness by means of atomic force microscopy, and chemical characterization by X-ray diffraction in various treatments for metal surface modification. Animal endothelial cells are viable and safe to evaluate and validate metal surfaces applied to stents.

Evaluating biological effects mainly used *in vitro* methods such as: cytotoxicity and biocompatibility through MTT tests, which in turn also allows for quantifying cell proliferation at a given time; morphology by Scanning Electron Microscopy can reveal whether cell form integrity has been preserved a good indication that functions are also being maintained; cell physiology can also be studied *in vitro*, using specific markers of endothelial cells such as nitric oxide, endothelin-1, VCAM, ICAM and vitronectin adhesion proteins; and reducing inflammatory processes based on cytokine analyses (TNF- α , IL-1 β and IL-6). These were the most frequently used methodologies to investigate biocompatibility.

Using endothelial cells should better clarify cellular and molecular mechanisms involved in biocompatibility of metallic materials. Since the endothelial cell line species may be the same as those used for the pre-clinical test, it will be possible to more accurately predict how the device will perform in the animal model. In addition, it is essential that a standard protocol for *in vitro* testing with animal endothelial cells according to the metal and surface treatment be established and validated. This will help to reduce the number of animals by minimizing research costs and increasing the efficiency and safety of pre-clinical trials.

Our perspective is that further studies using animal cells should be done to characterize molecular responses and intrinsic inter- and intracellular mechanisms, resulting from cell interactions and metallic biomaterials. Clearly, this would contribute to filling in scientific gaps, since there are no comparisons in the same publications on the response between animal ECs and human ECs for metal surfaces applied to stents. Therefore, a comparative study is necessary to establish an ideal model.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The authors wish to acknowledge the professional efforts of John P. Kastelic, DVM, Ph.D., from Calgary University for his contributions in this article.

REFERENCES

1. Organização Mundial da Saúde. WH mortality database. 2015. Available at:<http://apps.who.int/healthinfo/statistics/mortality/whodpms/>.(Accessed 06.20.18).
2. Smith EJ, Jain AK, Rothman MT. New developments in coronary stent technology. *J Interv Cardiol.* 2006,19: 493-499.
3. McNichols C, Wilkins J, Kubota A, Shiu YT, Aouadi SM, Kohli, P. Investigating surface topology and cyclic-RGD peptide functionalization on vascular endothelialization. *J Biomed Mater Res A.* 2014,102:532-539.
4. Iaccarino G, Ciccarelli M, Sorriento D, Cipolletta E, Cerullo V, Iovino GL, Paudice A, Elia A, Santulli G, Campanile A, Arcucci O. AKT participates in endothelial dysfunction in hypertension. *Circulation.* 2004,109: 2587-2593.
5. Santulli G, Wronska A, Uryu K, Diacovo TG, Gao M, Marx SO, Marks AR. A selective microRNA-based strategy inhibits restenosis while preserving endothelial function. *Eur J Clin Invest.*2014, 124:4102-4114.
6. Pinkney JH, Stehouwer CD, Coppack SW, Yudkin JS. Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. *Diabetes.* 1997, 46: S9-S13.
7. Gallagher GL, Sumpio BE. Endothelial cells. In: DePalma RG, Sidawy NA, editors. *The Basic Science of Vascular Disease.* 1st ed. New York: Futura Publishing Company;1997. p. 151-186.
8. Darnell M, Mooney DJ. Leveraging advances in biology to design biomaterials. *Nat Mater.* 2017, 16:1178.
9. Iqbal J, Gunn J, Serruys PW. Coronary stents: Historical development, current status and future directions. *Br Med Bull.* 2013,106: 193–211.
10. Mani G, Feldman MD, Patel D, Agrawal CM. Coronary stents: a materials perspective. *Biomaterials.* 2007, 28: 1689-1710.

11. Leng YX, Chen JY, Yang P, Sun H, Wang J, Huang N. The biocompatibility of the tantalum and tantalum oxide films synthesized by pulse metal vacuum arc source deposition. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. 2006, 242: 30–32.
12. Macionczyk F, Gerold B, Thull R. Repassivating tantalum/tantalum oxide surface modification on stainless steel implants. *Surf Coat Technol*. 2001, 142–144: 1084–1087.
13. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen, P. *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*. Berlin: Springer Science; 2012. 1019.p.
14. Hedberg YS, Qian B, Shen Z, Virtanen S, Wallinder IO. In vitro biocompatibility of CoCrMo dental alloys fabricated by selective laser melting. *Dent Mater*. 2014, 30: 525-534.
15. Yang D, Lü X, Hong Y, Xi T, Zhang D. The molecular mechanism for effects of TiN coating on NiTi alloy on endothelial cell function. *Biomaterials*. 2014, 35: 6195-6205.
16. Uthamaraj S, Tefft BJ, Klabusay M, Hlinomaz O, Sandhu GS, Dragomir-Daescu D. Design and validation of a novel ferromagnetic bare metal stent capable of capturing and retaining endothelial cells. *Ann Biomed Eng*. 2014, 42: 2416-2424.
17. Sullivan SJ, Madamba D, Sivan S, Miyashiro K, Dreher ML, Trépanier C, Nagaraja S. The effects of surface processing on in-vivo corrosion of Nitinol stents in a porcine model. *Acta Biomater*. 2017, 62: 385-396.
18. US Food and Drug Administration. Non-clinical engineering tests and recommended labeling for intravascular stents and associated delivery systems: guidance for industry and FDA staff. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Centre for Devices and Radiological, Health, 2010.
19. Suzuki Y, Yeung AC, Ikeno F. The importance of pre-clinical animal testing in interventional cardiology. *Arq Bras Cardiol*. 2008, 91: 348-360.

20. Hauser S, Jung F, Pietzsch J. Human endothelial cell models in biomaterial research. *Trends Biochem Sci.* 2017, 35: 265-77.
21. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials.* 2007, 28: 5009-27.
22. Yamazaki K, Lehr JE, Rhim JS, Pienta KJ. Establishment of an immortalized Copenhagen rat bone marrow endothelial cell line. *In vivo.* 1996, 10: 459-462.
23. Lokeshwar VB, Iida N, Bourguignon LY. The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. *J Biol Chem.* 1996, 271: 23853-23864.
24. Maher SE, Karmann K, Min W, Hughes CC, Pober JS, Bothwell AL. Porcine endothelial CD86 is a major costimulator of xenogeneic human T cells: cloning, sequencing, and functional expression in human endothelial cells. *J Immunol.* 1996, 157: 3838-3844.
25. Buonassisi V, Venter JC. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A .* 1976, 73:1612-1616.
26. Christenson LK, Stouffer RL. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from the primate corpus luteum. *Biol Reprod.*1996, 55: 1397-1404.
27. Olyslaegers DA, Desmarets LM, Dedeurwaerder A, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. Generation and characterization of feline arterial and venous endothelial cell lines for the study of the vascular endothelium. *BMC Veterinary Research.* 2013, 9: 170-180.
28. Lamar CH, Turek JJ, Bottoms GD, Fessler JF. Equine endothelial cells in vitro. *Am J Vet Res.*1986, 47: 956-958.
29. Zhu W, Tian Y, Zhou LF, Wang Y, Song D, Mao Y, Yang GY. Development of a novel endothelial cell-seeded endovascular stent for intracranial aneurysm therapy. *J Biomed Mater Res A.* 2008, 85: 715-721.

30. Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, Carter A, Granada JF, Kaluza GL, Chronos NA, Robinson KA, Waksman R, Weinberger J, Wilson GJ. Drug-eluting stents in preclinical studies updated consensus recommendations for preclinical evaluation. *Circ Cardiovasc Interv.* 2008. 1: 143-153.
31. Yazdani SK, Nakano M, Otsuka F, Kolodgie FD, Virmani R. Modelos animales de reparación vascular y reendotelización. *Rev Esp Cardiol.* 2013,13: 20-28.
32. Lukovic D, Nyolczas N, Hemetsberger R, Pavo IJ, Pósa A, Behnisch B, Horak G, Zlabinger K, Gyöngyösi M. Human recombinant activated protein C-coated stent for the prevention of restenosis in porcine coronary arteries. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 2015, 26:1-10.
33. Balls M. Future improvements: replacement in vitro methods. *ILAR J.* 2002, 43: 69-73.
34. Bowman PD, Ennis SR, Rarey KE, Lorris Betz A, Goldstein GW. Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: A model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol.* 1983, 14: 396-402.
35. Wang JM, Chen AF, Zhang K. Isolation and primary culture of mouse aortic endothelial cells. *J Vis Exp.* 2016, 118: e52965-e52965.
36. Marelli-Berg FM, Peek E, Lidington EA, Stauss HJ, Lechler RI. Isolation of endothelial cells from murine tissue. *J Immunol Methods.* 2000, 244: 205-215.
37. Choi S, Kim JA, Kim KC, Suh SH. Isolation and in vitro culture of vascular endothelial cells from mice. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2015, 19: 35-42.
38. Choudhary S, Berhe M, Haberstroh KM, Webster TJ. Increased endothelial and vascular smooth muscle cell adhesion on nanostructured titanium and CoCrMo. *Int J Nanomedicine.* 2006, 1: 41-49

39. Choudhary S, Haberstroh KM, Webster TJ. Enhanced functions of vascular cells on nanostructured Ti for improved stent applications. *Tissue Eng.* 2007,13: 1421-1430.
40. Khang D, Lu J, Yao C, Haberstroh KM, Webster TJ. The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium. *Biomaterials.* 2008, 29: 970-983.
41. Lu J, Khang D, Webster TJ. Greater endothelial cell responses on submicron and nanometer rough titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2010, 94: 1042-1049.
42. Lu J, Rao MP, MacDonald NC, Khang D, Webster TJ. Improved endothelial cell adhesion and proliferation on patterned titanium surfaces with rationally designed, micrometer to nanometer features. *Acta Biomater.* 2008, 4: 192-201.
43. Lu J, Yao C, Yang L, Webster TJ. Decreased platelet adhesion and enhanced endothelial cell functions on nano and submicron-rough titanium stents. *Tissue Eng Part A.* 2012, 18:1389-1398.
44. Lu J, Webster TJ. Reduced immune cell responses on nano and submicron rough titanium. *Acta Biomater.* 2015, 16: 223-231.
45. Samaroo HD, Lu J, Webster TJ. Enhanced endothelial cell density on NiTi surfaces with sub-micron to nanometer roughness. *Int J Nanomedicine.* 2008, 3: 75-82.
46. Lahann J, Klee D, Thelen H, Bienert H, Vorwerk D, Ho H. Improvement of haemocompatibility of metallic stents by polymer coating. *J Mater Sci Mater Med.* 1999, 10: 443-448.
47. Storey DM, McGrath TS, Shimpi TM. U.S. Patent No. 7,250,195. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 2007.
48. Pareta RA, Reising AB, Miller T, Storey D, Webster TJ. Increased endothelial cell adhesion on plasma modified nanostructured polymeric and metallic surfaces for vascular stent applications. *Biotechnol Bioeng.* 2009, 103: 459-471.

49. Raimondo T, Puckett S, Webster TJ. Greater osteoblast and endothelial cell adhesion on nanostructured polyethylene and titanium. *Int J Nanomedicine*. 2010, 5: 647-652.
50. Fin E, Zhang L, Fenniri H, Webster TJ. Enhanced endothelial cell functions on rosette nanotube-coated titanium vascular stents. *Int J Nanomedicine*. 2009, 4: 91-97.
51. Park J, Bauer S, Schmuki P, Von Der Mark K. Narrow window in nanoscale dependent activation of endothelial cell growth and differentiation on TiO₂ nanotube surfaces. *Nano Lett*. 2009, 9: 3157-3164.
52. Li QL, Huang N, Chen C, Chen JL, Xiong KQ, Chen JY, You TX, Jin J, Liang X. Oriented immobilization of anti-CD34 antibody on titanium surface for self endothelialization induction. *J Biomed Mater Res A*. 2010, 94: 1283-1293.
53. Chen J, Cao J, Wang J, Maitz MF, Guo L, Zhao Y, Li Q, Xiong K, Huang N. Biofunctionalization of titanium with PEG and anti-CD34 for hemocompatibility and stimulated endothelialization. *J Colloid Interface Sci*. 2012, 368: 636-647.
54. Booyse FM, Sedlak BJ, Rafelson Jr ME. Culture of arterial endothelial cells: characterization and growth of bovine aortic cells. *Thromb Diath Haemorrh*. 1975, 34: 825-839.
55. Ryan US, Clements E, Habliston D, Ryan JW. Isolation and culture of pulmonary artery endothelial cells. *Tissue Cell*. 1978, 10: 535-554.
56. Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979, 76: 5217-5221.
57. McAuslan BR, Johnson G, Delamore GW, Gibson MA, Steele JG. Cell growth on metallic glasses: The interaction of amorphous metal alloys with cultured neuronal, osteoblast, endothelial, and fibroblast cells. *J Biomed Mater Res A*. 1988, 22: 905-917.

58. Fischell TA, Kharma BK, Fischell DR, Loges PG, Coffey CW, Duggan DM, Naftilan AJ. Low-dose, beta-particle emission from stent wire results in complete, localized inhibition of smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 1994, 90: 2956-2963.
59. Polyak B, Fishbein I, Chorny M, Alferiev I, Williams D, Yellen B, Friedman G, Levy RJ. High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105: 698-703.
60. Brammer KS, Oh S, Gallagher JO, Jin S. Enhanced cellular mobility guided by TiO₂ nanotube surfaces. *Nano Lett*. 2008, 8: 786-793.
61. Grinevich A, Bacakova L, Choukourov A, Boldyryeva H, Pihosh Y, Slavinska D, Noskova L, Skuciova M, Lisa V, Biederman H. Nanocomposite Ti/hydrocarbon plasma polymer films from reactive magnetron sputtering as growth support for osteoblast like and endothelial cells. *J Biomed Mater Res A*. 2009, 88: 952-966.
62. Loya MC, Brammer KS, Choi C, Chen LH, Jin S. Plasma-induced nanopillars on bare metal coronary stent surface for enhanced endothelialization. *Acta Biomater*. 2010, 6: 4589-4595.
63. Beltrán-Partida E, Valdéz-Salas B, Moreno-Ulloa A, Escamilla A, Curiel MA, Rosales-Ibáñez R, Villarreal F, Bastidas DM, Bastidas JM. Improved in vitro angiogenic behavior on anodized titanium dioxide nanotubes. *J Nanobiotechnology*. 2017, 15: 1-21.
64. Slater DN, Sloan JM. The porcine endothelial cell in tissue culture. *Atherosclerosis*. 1975, 21: 259-272.
65. Malassagne B, Taboit F, Conti F, Batteux F, Atia N, Chéreau C, Conjeaud H, Théron MC, Attal J, Braet F, Houdebine LM. A newly established porcine aortic endothelial cell line: characterization and application to the study of human-to-swine graft rejection. *Exp Cell Res*. 1998, 238: 90-100.

66. Carrillo A, Chamorro S, Rodríguez-Gago M, Álvarez B, Molina MJ, Rodríguez-Barbosa JI, Sánchez A, Ramírez P, Muñoz A, Domínguez J, Parrilla P. Isolation and characterization of immortalized porcine aortic endothelial cell lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002, 89: 91-98.
67. Ryan US, Ryan JW, Whitaker C, Chiu A. Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence. *Tissue Cell.* 1976, 8: 125-145.
68. Tontsch U, Bauer HC. Isolation, characterization, and long-term cultivation of porcine and murine cerebral capillary endothelial cells. *Microvasc Res.* 1989, 37: 148-161.
69. Shi HJ, Cao AH, Teng GJ. Seeding endothelial progenitor cells on a self-expanding metal stent: an in vitro study. *J Vasc Interv Radiol.* 2010, 21:1061-1065.
70. Achneck HE, Jamiolkowski RM, Jantzen AE, Haseltine JM, Lane WO, Huang JK, Galinat LJ, Serpe MJ, Lin FH, Li M, Parikh A. The biocompatibility of titanium cardiovascular devices seeded with autologous blood-derived endothelial progenitor cells: EPC-seeded antithrombotic Ti implants. *Biomaterials.* 2011, 32: 10-18.
71. Han SG, Newsome B, Hennig B. Titanium dioxide nanoparticles increase inflammatory responses in vascular endothelial cells. *Toxicol.* 2013, 306:1-8.
72. Barsotti MC, Al Kayal T, Tedeschi L, Dinucci D, Losi P, Sbrana S, Briganti E, Giorgi R, Chiellini F, Di Stefano R, Soldani G. Oligonucleotide biofunctionalization enhances endothelial progenitor cell adhesion on cobalt/chromium stents. *J Biomed Mater Res A.* 2015, 103: 3284-3292.
73. Gerhart DZ, Broderius MA, Drewes LR. Cultured human and canine endothelial cells from brain microvessels. *Brain Res Bull.* 1988, 21: 785-793.

74. Wu H, Riha GM, Yang H, Li M, Yao Q, Chen C. Differentiation and proliferation of endothelial progenitor cells from canine peripheral blood mononuclear cells 1, 2. *J Surg Res.* 2005, 126: 193-198.
75. Smith JM, Meinkoth JH, Hochstatter T, Meyers KM. Differential distribution of von Willebrand factor in canine vascular endothelium. *Am J Vet Res.* 1996, 57: 750-755.
76. Chen Z, Li Q, Chen J, Luo R, Maitz MF, Huang N. Immobilization of serum albumin and peptide aptamer for EPC on polydopamine coated titanium surface for enhanced in-situ self-endothelialization. *Mater Sci Eng C.* 2016. 60:219-229.

**CAPÍTULO 02 – NITRETAÇÃO A PLASMA DO AÇO INOXIDÁVEL 316L
SOB BAIXA TEMPERATURA MELHORA A BIOCAMPATIBILIDADE DE
CÉLULAS ENDOTELIAIS**

Plasma nitriding under low temperature improves the endothelial cell biocompatibility of 316L stainless steel

Artigo publicado
Biotechnology Letters

Braz, J.K., Martins, G.M., Sabino, V., Vitoriano, J.O., Barboza, C.A.G., Soares, A.K.M., Rocha, H.A., Oliveira, M.F., Júnior, C.A. and Moura, C.E.B. **Plasma nitriding under low temperature improves the endothelial cell biocompatibility of 316L stainless steel.** Biotechnology Letters, v. 41, n. 4, p.503-510,2019. DOI: 10.1007/s10529-019-02657-7

**CAPÍTULO 03 – VISCOELASTICIDADE DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS VIVAS
SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO TRATADAS A PLASMA**

Viscoelasticity of live endothelial cells on plasma-treated titanium surfaces

Artigo
Applied Surface Science

Abstract

Titanium plasma treatment promotes good biocompatibility results, but its influence on the mechanobiology of living endothelial cells has not yet been investigated. In this context, this study aimed to evaluate the effects of titanium plasma nitriding and oxidation on endothelial cell viscoelasticity. For this purpose, mechanically polished titanium (TiP) surfaces and two surfaces treated by planar cathode discharge in nitriding (36N_2 and 24H_2) and oxidant (36O_2 and 24H_2) atmospheres at 450°C were used. Titanium surfaces were characterized regarding wettability, roughness and chemical composition. Rabbit aortic endothelial cells (RAECs) were cultured on the titanium surfaces. Cell morphology was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). Viability was assessed by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and the viscoelasticity of living cells was determined by atomic force microscopy (AFM). X-ray diffraction (XRD) confirmed the incorporation of nitrogen and oxygen to the treated titanium surfaces. Both plasma treatments increased surface roughness, but the peaks were more regular on the nitrided surfaces. However, oxidation led to a more hydrophilic titanium surface ($66.59^\circ \pm 3.65$ vs $76.88^\circ \pm 2.68$; $p=0.001$). After 24h, cell viability on the oxidized surface was higher in comparison to the nitrided surface (9.1×10^3 vs 4.5×10^3 cells; $p<0.05$). Surface oxidation increased the viscoelasticity of cell peripheries in relation to the nucleus ($2.36 \pm 0.3 \text{ N/m}^2$ vs $1.5 \pm 0.4 \text{ N/m}^2$; $p<0.05$), on the other hand to RAECs periphery on nitrided surfaces ($1.36 \pm 0.7 \text{ N/m}^2$; $p<0.05$) and polished surfaces ($1.55 \pm 0.6 \text{ N/m}^2$; $p<0.05$). Physical force interactions between the cells and the oxidized surface led to higher endothelial cell viability. The titanium plasma treatment directly influenced cell viscoelasticity, and this mechanobiological property subsequently interfered in biocompatibility.

Keywords: Implants, nitriding, oxidation, biocompatibility, viscoelastic properties.

Introduction

Restenosis is one of the major complications in patients using intravascular devices. Its main cause is a vascular endothelium dysfunction, leading to uncontrolled antithrombotic activity, resulting in blood flow blockage [1]. Although the use of new stent generations have reduced restenosis rates, patient risks are still imminent [2]. Because of this, the field of bioengineering has sought biomaterials and surface modification methods that guarantee patient quality of life [3,4].

Titanium is one of the most recommended biomaterials for biomedical applications, used in pumps and cardiac devices [5,6]. This metal is biocompatible, presents adequate hardness and is corrosion resistant, guaranteeing its quality as a biomaterial. In this context, surface roughness and wettability are important parameters concerning cell integration processes, such as osseointegration [7]. However, to guarantee tissue repair in addition to bone integration, angiogenesis using endothelial cells (EC) is required [8]. The interaction of these cells with titanium surfaces can trigger the activation of cell adhesion proteins (integrins), as well as rapid adhesion, proliferation and development of normal endothelial function [9,10]. Titanium surface modifications allow for improvements in cellular response and the prevention of restenosis of intra-stents comprising this metal [11].

Plasma processing aiming at surface modifications has been known and applied for over 20 years, with the aim of improving physical and chemical properties of several materials [5]. This is considered a low cost and safe method, as it does not use environmental chemicals and/or pollutants [12]. Plasma treatment of metallic surfaces has displayed good results regarding cell behavior, as well as antibacterial potential [7,13]. Usually evaluations concerning cell adhesion, proliferation and viability on titanium surfaces are performed. However, alterations in the mechanical properties of different cell regions under the influence of the applied biomaterial are usually neglected by researchers.

The interactions between cells or biological tissues and physical forces lead to functional implications, which are characterized by mechanical properties [14]. External mechanical forces stimulate cells to respond through mechanosensitivity (the cellular sensory ability to perceive the material); mechanotransduction (intracellular biochemistry alterations), and mechanoreponse (integration of cellular signals for cell motility and contractility modifications)[15]. This is how the cell responds to mechanical environmental changes promoted by modulation force alterations or cytoskeleton organization (morphology and motility), which directly interfere in stiffness, consequently altering viscoelasticity properties[16–19]. Alterations in viscoelastic properties occur heterogeneously in the cellular environment, and can be quantified in a liquid environment through atomic force microscopy (AFM)[20]. Because it is a non-invasive method, it is considered a promising tool to perform diagnoses in the medical clinical practice, such as in assessing cardiovascular disease risks [21]. Although pathological changes may be detectable through cell biomechanics relative to the applied material [14], no studies applying this property as a tool to evaluate the biocompatibility of plasma-treated metal materials are available.

In this context, the aim of this study was to investigate the effect of nitriding and plasma oxidation on titanium surfaces by evaluating endothelial cell behavior and the effects on the mechanobiology of these cells.

Material and methods

Preparation and characterization of titanium disks

II-grade Ti disks with pre-established dimensions (diameter: 19 mm, thickness: 3 mm) supplied by Mettalum Brazil were used. All surfaces were previously sanded with silicon carbide grit with granulometry ranging from 80 to 2000 MESH. Polishing was performed using a colloidal silica and hydrogen peroxide solution on an OP-CHEM polishing cloth for 30 minutes. For the preparation of nitrided surface (SN) and oxidized surface (SO) disks, the disks were pre-cleaned to remove contaminants, through ionic bombardment of 2.0 sccm of argon and 2 sccm of hydrogen at 200°C, at 1.5 mbar, 448 V and 0.1 A current for 30 minutes. The disks were then conditioned in a vacuum plasma reactor for the plasma treatment under a nitrogen atmosphere (36N₂ and 24H₂) for SN and oxidizer (36O₂ and 24H₂) for SO in a 200x300 mm hermetic cylindrical chamber (diameter and height), under 1 mbar pressure, at 450°C for 1 hour.

Surface characterization

The surface nanotopography analysis was based on roughness parameters (Rp, Rz and Rp/Rz) obtained using an Atomic Force Microscope (model SPM 9700, Shimadzu). Wettability was determined through the sessile drop method [22], which consists in measuring the angle formed by a 20 µl drop of deionized water pipetted onto the surfaces by means of a video camera image capture of the goniometer using the Suftens software to obtain the contact angles. The surfaces were chemically evaluated by the Grazing Incidence x-Ray Diffraction technique (GIXRD), whose incidence angle is flat and fixed, with scanning detection at 2θ through a diffractometer [22].

Rabbit aorta cells (RAECs) culture

The established lineage of rabbit aortic endothelial cells (RAECs) was purchased from the São Paulo Federal University Cell Bank. The cells were expanded in HAM-F12 medium, supplemented with fetal bovine serum (10%), and penicillin/streptomycin antibiotics (100U mL, 100 µg/mL, respectively). Subsequently they were incubated at 37°C in a 5% CO₂

chamber, with culture medium exchange every 48 hours. After reaching confluence (80-90%), the RAECs were subjected to the assessed surfaces.

Cellular Morphology

Endothelial cells were cultured on the surfaces for 4 h for morphological evaluations. The disks were washed with phosphate buffer solution (PBS), fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS, pH 7.2, and post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer. The samples were then dehydrated in an increasing ethanol series and metallized with gold (Q Plus Series, Quorum Technologies Ltd, Laughton, England). Images were captured by a Scanning Electron Microscope (SEM) (SEM-SSX 550 Superscan, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan).

Cell viability

RAEC (2×10^3 cells/disk) were cultured on the surfaces for 24h, followed by the addition of 1 mL of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) diluted in the culture medium. After 3h of incubation, the formazan crystals produced by the reduction of MTT were dissolved by the addition of 1 mL of ethanol P.A. (*ACS reagent* $\geq 99.5\%$) in each well for 15 minutes under constant stirring. Then, 100 μ L of each well were transferred to 96-well culture plates and quantified by absorbance spectrophotometry at 570 nm on a microplate reader (Quant MKX200, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Absorbance values were converted into cell numbers through a standard growth curve for 24h.

Atomic Force Microscopy (AFM)

An MFP-3D-Bio AFM system (Asylum Research) mounted on an Olympus Inverted Optical Microscope with use of Soft TR400PB Microcantilevers (BL-TR400PB Olympus/Asylum Research) was used. The analyses were performed in tapping mode with nominal spring constant of 0.09 N/m and nominal tip radius of 42 nm (± 12 nm). The cantilever was mounted on the iDrive force excitation for direct cantilever excitation, passing an alternating current through the V-shaped Cantilever. After calibration, the cantilever was directly directed in the frequency bending mode (6-8 kHz) away from the sample and then onto the living cells. The amplitude removed from the sample was set to approximately 8-18 nm. The deflection set point for imaging was of ~ 20 -35 nm (force ~ 1.5 nN). The phase was adjusted to $+90^\circ$, with Thermal Q constant of ~ 2.0 -2.3.

Moving the AFM cantilever on the z-axis of the sample with a controlled force will result in indentations if the sample is soft. According to Hooke's law, the indentation can be recorded as a force function, which is proportional to the cantilever deflection. Therefore, force curves are the result of the set of forces versus indentation, and imply in qualitative elasticity results, as the greater the slope of the force curve, the greater the rigidity of said surface. It is also possible to calculate the elastic property of the surfaces, applying the theoretical Hertz model (1882) to analyze the force curves. This model relates the force of a load F with an indentation δ according to the following equation:

$$F = \frac{2}{\pi} \times \frac{E}{(1-\nu^2)} \times \delta^2 \times \tan(\alpha)$$

Where E is Young's elastic modulus, α is the opening angle of the recoil cone and ν is Poisson's constant of the sample, considered here in as 0.5. Thus, two parameters are extracted from each force curve of the Young modulus of the sample and the point of contact. The force-indentation curves were obtained and analyzed using the IGOR Pro Software 6.37 to process the quantitative data.

Mechanical cell properties

A total of 5×10^4 cells/disk were cultured in HAM-F12 medium and incubated at 37°C in a 5% CO_2 chamber. After 24h, the disks were washed two times with PBS and plated with Tyron solution at 37°C . A total of 32 force curves were analyzed for each cell ($n = 6$), 16 for cell nuclei and 16 for peripheral cell regions for each type of treatment. The AFM methodology was applied in dynamic mode, which consists in obtaining viscosity loss modules (E_{loss}) and the elastic storage module ($E_{storage}$) to understand viscoelasticity (result of the $E_{loss}/E_{storage}$ ratio) [23].

Statistical analyses

The experiments were performed in replicate for each surface. A One-Way ANOVA test followed by multiple comparative tests was applied for surface roughness and wettability. The MTT and mechanical property data were submitted to an analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc student's t test ($p < 0.05$).

Results

Surface characterization

The material roughness profiles are displayed in Figure (1A-F). Plasma nitriding generated a differentiated oxidized surface topography (Figure 1C-D). The 3D atomic force microscopy images reveal more regular peaks, significantly influencing nitrided surface roughness when compared to the oxidized surfaces (Figure 1E-F). The roughness parameters R_a , R_p , R_z and the R_p/R_z ratio were obtained based on these profiles (Table 1). The plasma treatment significantly increased roughness in both treated surfaces compared to the polished surface, with the highest values observed for the nitrided surfaces. The mean roughness (R_a) of the nitrided titanium surface was higher (27.72 ± 1.3 nm, $p < 0.05$) than that of the oxidized (10.28 ± 1.1 nm, $p < 0.05$) and polished (1.3 ± 0.2 nm, $p < 0.05$) surfaces. Although the peak height (R_p) and maximum profile height (R_z) were significantly higher in the nitrided surfaces (140.14 ± 23.5 , 176.50 ± 78.9 , respectively) compared to the other surfaces, no R_p/R_z ratio variation was observed.

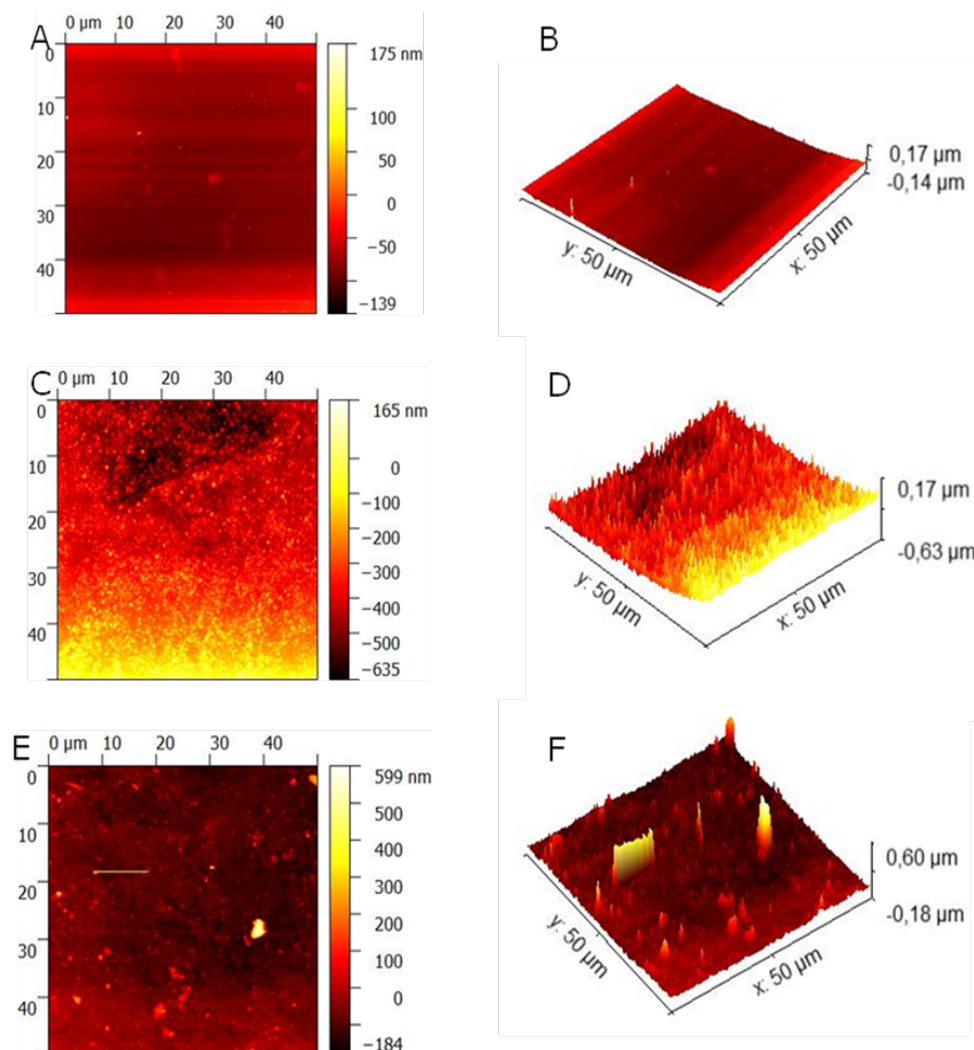


Figure 1 –Titanium nanotopography by AFM. (A-B) Polished titanium surface. (C-D) Plasma nitride titanium surface. (E-F) Oxidized titanium surface. Area =10x10 μm .

Table 1 - Roughness parameters (nm) of the titanium surfaces.

Surface	Ra	Rp	Rz	Rp/Rz
Polish	$1,3 \pm 0,2^a$	$6,84 \pm 0,2^a$	$9,88 \pm 0,9^a$	$0,7 \pm 0,1$
Nitride	$27,72 \pm 1,3^b$	$140,14 \pm 23,5^b$	$176,50 \pm 78,9^b$	$1.89 \pm 2,5$
Oxidized	$10,28 \pm 1,1^c$	$62,98 \pm 13,0^c$	$95,86 \pm 21,8^c$	0.67 ± 0.6

Different letters ($p < 0,001$).

In addition, the contact angle of the nitrated surface was higher when compared to the polished ($76.88^\circ \pm 2.68$ versus $67.83^\circ \pm 4.7$; $p=0.001$) (Figure 2) and oxidized ($66.59^\circ \pm 3.65^\circ$; $p=0.001$) surfaces. Thus, nitrating resulted in a more hydrophobic titanium surface, while plasma oxidation improved surface hydrophilicity. The XRD confirmed the incorporation of nitrogen and oxygen onto the titanium surfaces (Figure 3A-B).

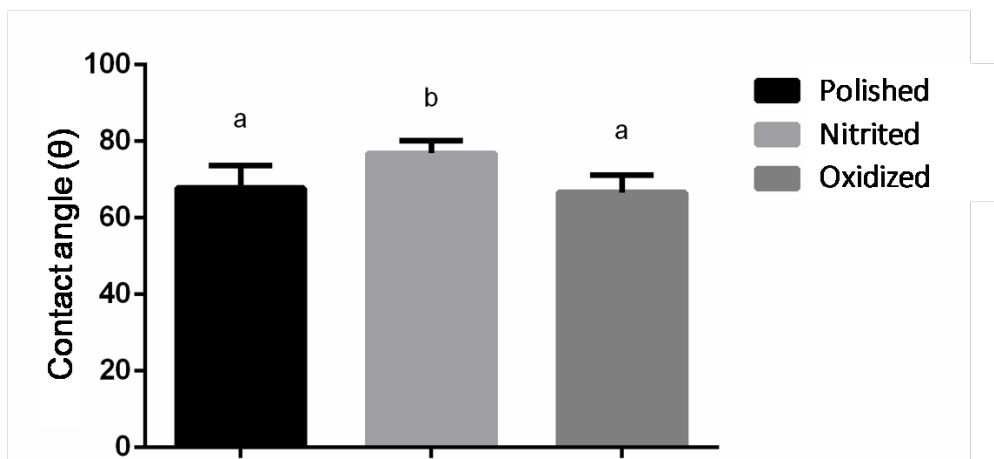


Figure 2 - Contact angle per sessile drop of the polished, nitrated and oxidized plasma surfaces. Different letters ($p < 0.001$).

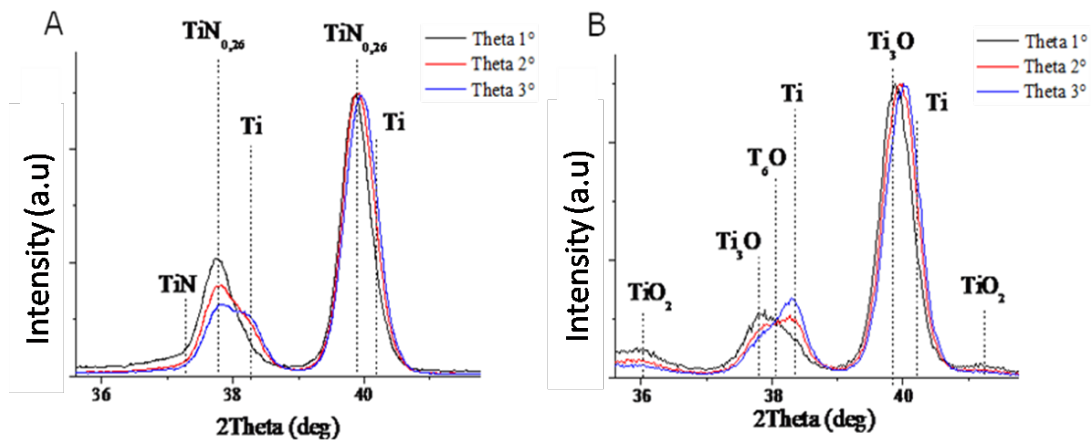


Figure 3 - Diffractogram of the plasma treated titanium surface at theta contact angles Theta 1°, Theta 2° and Theta 3°. (A) Plasma nitration. (B) Plasma oxidation.

Cell morphology

Adherent cells were observed on the samples after 4h. Cells adhered to the polished surface were more rounded form, similar to the oxidized surface, but presenting thinner and longer filopodia (Figure 4A-B). Cell morphology on the nitrated titanium, on the other hand, was elliptical, with thicker and shorter filopodia (Figure 4C).

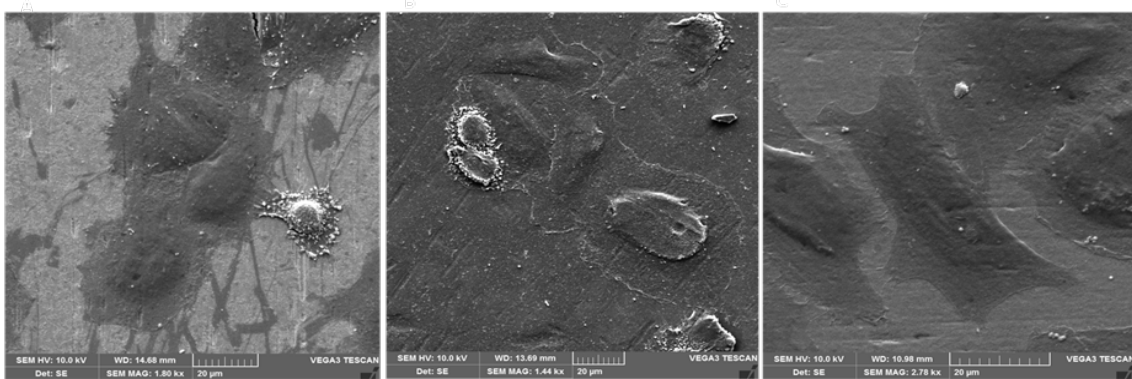


Figure 4 - Scanning electron microscopy of RAEC cells grown on the titanium surface. (A) RAECs grown on the polished surface, displaying rounded morphology and emission of cytoplasmic extensions. (B) RAECs grown on the oxidized surface. (C) RAECs grown on the plasma nitrated surface, displaying elliptic morphology.

Cell viability

The MTT assay indicated that, after 24 h, cell viability on the oxidized surface (9.1×10^3 cells) was significantly higher compared to the nitride surface (4.5×10^3 cells; $p < 0.05$) and polished (5.3×10^3 cells; $p < 0.05$) surface. Although the polished surface increased cell

viability, there was no significant difference with the nitride sample (5.3×10^3 cells *versus* 4.5×10^3 cells; $p > 0.05$) (Figure 5).

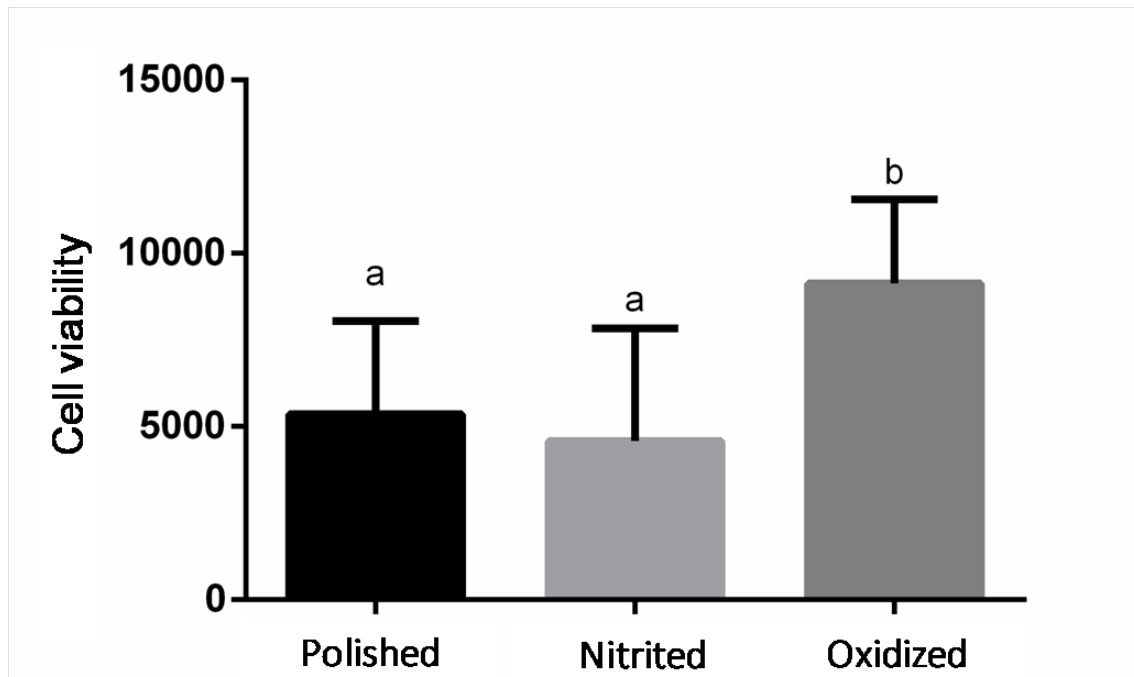


Figure 5 – Number of cell viability by MTT after 24 hours of culture on the polished, nitrided and oxidized Ti surfaces. Different letters ($p < 0.05$).

Viscoelasticity

The AFM images confirmed cell adhesion to the titanium surfaces after 24h (Figure 6A-E). E_{loss} and $E_{storage}$ data were obtained (Table 2) after a force-indentation curve analysis (Figure 7C-H). The plasma oxidation of the Ti surface increased cellular periphery viscoelasticity in comparison to the nucleus ($2.36 \pm 0.3 \text{ N/m}^2$ versus 1.5 ± 0.4 ; $p < 0.05 \text{ N/m}^2$), as well as in relation to the cellular periphery of cells adhered to the polished ($1.55 \pm 0.6 \text{ N/m}^2$; $p < 0.05$) and nitrided ($1.36 \pm 0.7 \text{ N/m}^2$; $p < 0.05$) surface (Figure 7A-B).

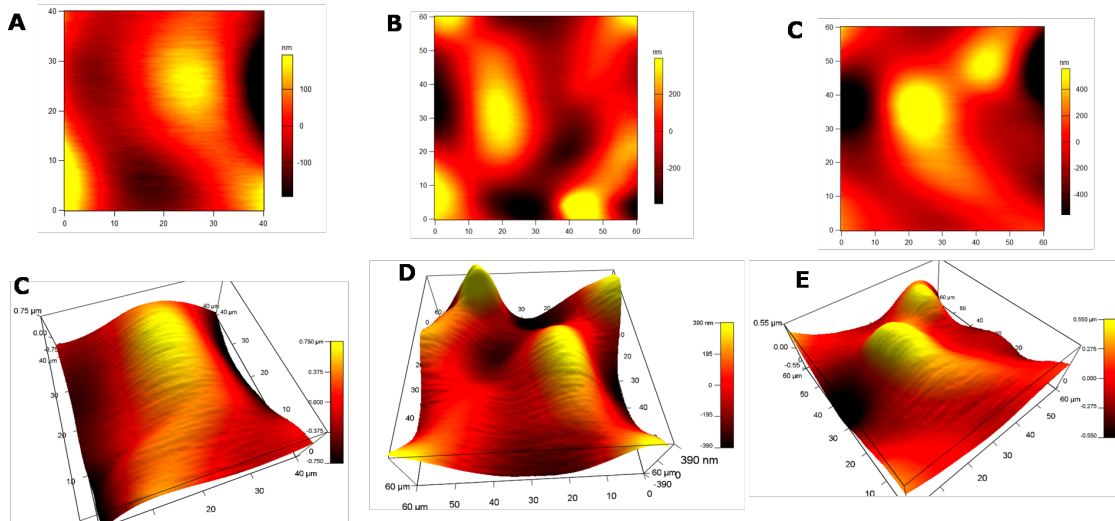


Figure 6 - Different live endothelial cell regions by AFM. (A-B) Polished titanium surface; Area = 40x40 μm . (B-D) Plasma nitrided titanium surface; Area =60x60 μm . (C-E) Oxidized titanium surface; Area =60x60 μm ; Yellow: cell nucleus.

Table 2 $-E_{storage}$ and E_{loss} parameters of the endothelial cell nuclear and peripheral regions cultured on the titanium surfaces.

Surface	Cell nucleus		Cell periphery	
	E_{loss}	$E_{storage}$	E_{loss}	$E_{storage}$
Polished	17816.97 ± 16276.69	11294.05 ± 12863.86	30591.53 ± 22546.84	22992.85 ± 19790.47
Oxidized	13371.43 ± 1642.51	9909.08 ± 3848.92	24463.87 ± 5608.71	12285.71 ± 6472.68
Nitrided	8763.26 ± 3686.08	7268.95 ± 1318.97	10188.03 ± 3735.69	8317.83 ± 2645.43

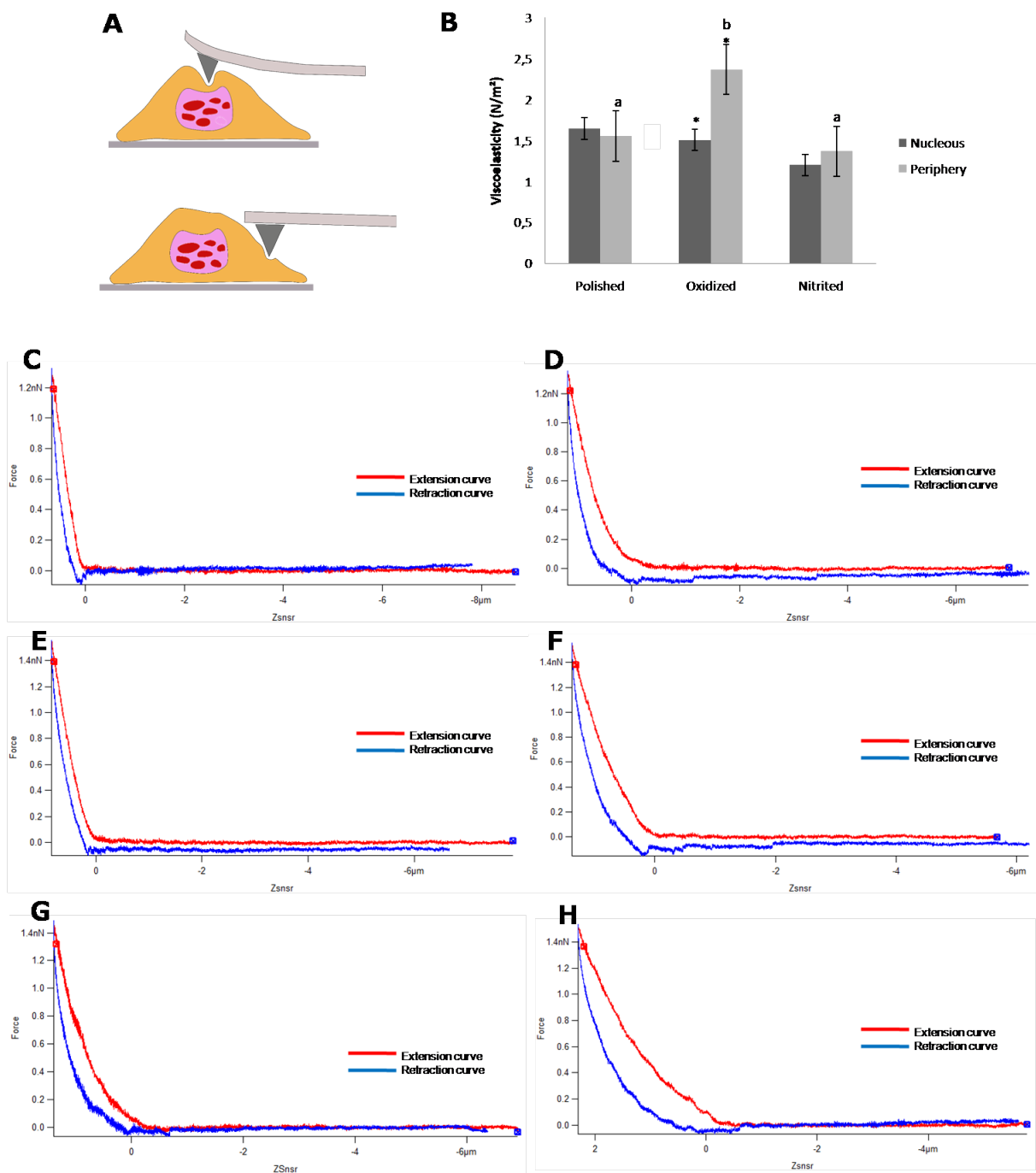


Figure 7 - Viscoelastic RAEC properties on different titanium surfaces. (A) Deflection of the cantilever in the nuclear and peripheral RAEC regions on titanium surfaces. (B) Viscoelasticity properties of the nuclear and peripheral RAEC regions on different titanium surfaces. (^{a-b}) cellular periphery viscoelasticity on the different surfaces; $p < 0.05$) (^{*})nucleus vs. periphery viscoelasticity on the oxidized surface; $p < 0.05$). Force-indentation curve on the polished titanium surface, nucleus (C) and cellular periphery (D). Force-indentation curve on the titanium nitride surface, nucleus (E) and cellular periphery (F). Force-indentation curve on the oxidized titanium surface, nucleus (G) and cellular periphery (H).

Discussion

Different types of blood flow tension forces may influence cardiovascular endothelium behavior [24]. These stimuli, both internal and external, directly influence mechanical cell properties, such as elasticity, as well as biological function [25]. Plasma treatments applied to titanium surfaces were shown to alter both topography and surface chemistry. In the present study, the effects of titanium surfaces modified by nitriding and plasma oxidation on endothelial cell viability was verified. This is the first report on the mechanical properties of live endothelial cells under the influence of plasma-modified metal surface characteristics as verified by atomic force microscopy.

The plasma treatment significantly increased the roughness patterns, maximum peak height (R_p) and maximum roughness profile height (R_z) of the titanium surfaces. However, a significant increase in nitrided surface roughness was also noted, where nitrogen ion implantation produced more regular peaks and significantly influenced roughness when compared to the oxidized and polished surfaces [26]. This topographic profile can induce greater platelet adhesion and activation. Therefore, nitriding a Ti surface to produce intravascular devices may trigger the formation of thrombi [27]. Furthermore, the lower the R_p/R_z ratio, the lower the contact angle, thus raising hydrophilic potential [13]. Although no significant difference in the R_p/R_z ratio concerning the evaluated surfaces was observed, an increase in plasma oxidized titanium wettability occurred, where the oxidized surface displayed higher hydrophilicity when compared to nitride surface. Hydrophilic surfaces promote adhesion, cell elongation, cell movement and cell cluster formation [28].

Endothelial cell adhesion was observed after the first 4h after incubation on both the nitrided and oxidized surfaces. The oxidized surface, presenting lower average roughness and irregular topography, stimulated the increase of endothelial cell viability when compared to nitride surface. Thus, the findings reported herein confirm that endothelial cells, a type of epithelial cell, display a preference for surfaces presenting a lesser roughness degree. Some reports indicate that osteoblastic cells on titanium surfaces present greater roughness. However, fibroblast and epithelial cells have been reported as demonstrating a preference for smoother surfaces [29,30]. In addition, it is likely that the surface roughness of nitrided titanium inhibited intercellular endothelial cell contact [28]. Interendothelial contact sites are signal transduction sites that affect cell migration and act in the repair and *in vitro* and *in vivo* endothelium regeneration processes [31,32]. Thus, the oxidized surface reported herein may

offer better physiological conditions for angiogenesis in the post-implantation period in the cicatricial phase.

Mechanical cellular properties are involved in cellular form maintenance, i.e. cytoskeleton reorganization [33]. Cytoskeleton conformational changes depends on the interaction between proteins and focal extension organization, resulting in viscoelasticity[20]. Although the cell cytoplasm presents viscoelastic behavior in normal physiological conditions [34], titanium plasma nitriding did not significantly increase the viscoelasticity of endothelial cell peripheries when comparing the polished and oxidized surfaces. However, the oxidized surface significantly increased cellular periphery viscoelasticity in relation to the nitrided surface. Therefore, the higher stiffness observed in the cellular periphery on the nitrided surface led to decreased cell adhesion strength [24]. This may have led to reduced cell proliferation on nitrided surfaces after 24h.

The nucleus viscoelasticity in cells with carcinogenic potential influences cell morphology, where decreased viscoelasticity stimulates spreading cells, presenting more flattened form and longitudinal extensions [35]. In the present study, normal endothelial cells, although displaying a more spreaded form (flattened) with several prolongations, presented the highest nuclear viscoelasticity values, possibly due to the influence of the adhesion substrates, in this case the polished and oxidized surfaces. Lower fibroblast nucleus viscoelasticity has been reported as triggering nuclear deformation and fibronectin cell adhesion inhibition, decreased extracellular matrix strength [36]. The nitrided surface induced the lowest nuclear viscoelasticity reduction among the assessed surfaces, which may justify the decreased viability of these cells at 24h. The oxidized surface presented higher proliferation of these cells. Therefore it is possible that the increase of the elastic modulus of the cytoskeleton of the nuclear region prevented these nuclear deformations [37]. Another hypothesis includes a strengthening of the lamina lattice that hardens the isolated nuclei, as a strategy to protect chromatin against excessive mechanical stress [38]. Therefore, this study demonstrated that titanium plasma modification alters the elastic properties of adherent endothelial cells.

Conclusions

Despite the fact that titanium surface plasma nitriding and oxidation promoted adhesion and ensured the viability of rabbit aortic endothelial cells, the different surfaces differentially modified cellular viscoelastic properties. Therefore, the plasma titanium

oxidation presented promising *in vitro* results, which would justify its choice for *in vivo* tests concerning intravascular devices.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors wish to acknowledge the professional efforts of team of the Universidade Estadual de Campinas, as well as Dr. Eneida de Paula and Dr. Juliana Damasceno, from UNICAMP, São Paulo, Brazil for contributing with the surfaces roughness analyses by force atomic microscopy.

References

- [1] H. Nuhn, C.E. Blanco, T.A. Desai, Nanoengineered Stent Surface to Reduce In-Stent Restenosis *in Vivo*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 19677–19686. doi:10.1021/acsami.7b04626.
- [2] S. Borhani, S. Hassanajili, S.H. Ahmadi Tafti, S. Rabbani, Cardiovascular stents: overview, evolution, and next generation, *Prog. Biomater.* 7 (2018) 175–205. doi:10.1007/s40204-018-0097-y.
- [3] A. Khademhosseini, R. Langer, A decade of progress in tissue engineering, *Nat. Protoc.* 11 (2016) 1775–1781. doi:10.1038/nprot.2016.123.
- [4] M. Mozetič, Mozetič, Miran, Surface Modification to Improve Properties of Materials, *Materials (Basel)*. 12 (2019) 441. doi:10.3390/ma12030441.
- [5] C. Alves, C.L.B. Guerra Neto, G.H.S. Morais, C.F. da Silva, V. Hajek, Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge, *Surf. Coatings Technol.* 200 (2006) 3657–3663. doi:10.1016/J.SURFCOAT.2005.08.005.
- [6] O. Gorrieri, M. Fini, K. Kyriakidou, A. Zizzi, M. Mattioli-Belmonte, P. Castaldo, A. De Cristofaro, D. Natali, A. Pugnali, G. Biagini, In Vitro Evaluation of Bio-Functional Performances of Ghimas Titanium Implants, *Int. J. Artif. Organs*. 29 (2006) 1012–1020. doi:10.1177/039139880602901012.
- [7] C.E.B. Moura, N.B. Silva, J.C. Sa, G.B. Cavalcanti, S.R.B. de Medeiros, H.A.O. Rocha, P.C. Papa, C. Alves, MC3T3-E1 Cells Behavior on Surfaces Bombarded by Argon Ions in Planar Cathode Discharge, *Artif. Organs*. 40 (2016) 497–504. doi:10.1111/aor.12597.
- [8] A.C. Breithaupt-Faloppa, J. Kleinheinz, O. Crivello, Endothelial cell reaction on a biological material, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 76B (2006) 49–55. doi:10.1002/jbm.b.30340.
- [9] M.I. Santos, S. Fuchs, M.E. Gomes, R.E. Unger, R.L. Reis, C.J. Kirkpatrick, Response of micro- and macrovascular endothelial cells to starch-based fiber meshes for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 28 (2007) 240–248. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.08.006.

- [10] C. Moura, M. Queiroz Neto, J.K. Braz, M. Aires, N. Silva, C. Barboza, G. Cavalcanti Júnior, H.A. Rocha, C. Alves Junior, Effect of plasma-nitrided titanium surfaces on the differentiation of pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1), *Artif. Organs.* (2019). doi:10.1111/aor.13438.
- [11] D. Versari, L. Lerman, A. Lerman, The Importance of Reendothelialization After Arterial Injury, *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007) 1811–1824. doi:10.2174/138161207780831239.
- [12] P. Molitor, V. Barron, T. Young, Surface treatment of titanium for adhesive bonding to polymer composites: a review, *Int. J. Adhes. Adhes.* 21 (2001) 129–136. doi:10.1016/S0143-7496(00)00044-0.
- [13] A. Nunes Filho, M. de M. Aires, D.C. Braz, R. Hinrichs, A.J. Macedo, C. Alves, Titanium Surface Chemical Composition Interferes in the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation, *Artif. Organs.* 42 (2018) 193–199. doi:10.1111/aor.12983.
- [14] E.U. Azeloglu, K.D. Costa, Atomic Force Microscopy in Mechanobiology: Measuring Microelastic Heterogeneity of Living Cells, in: Humana Press, 2011: pp. 303–329. doi:10.1007/978-1-61779-105-5_19.
- [15] V. Vogel, M. Sheetz, Local force and geometry sensing regulate cell functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 265–275. doi:10.1038/nrm1890.
- [16] X. Shi, Y.-P. Zhao, Comparison of various adhesion contact theories and the influence of dimensionless load parameter, *J. Adhes. Sci. Technol.* 18 (2004) 55–68. doi:10.1163/156856104322747009.
- [17] B. Cappella, G. Dietler, Force-distance curves by atomic force microscopy, *Surf. Sci. Rep.* 34 (1999) 1–104. doi:10.1016/S0167-5729(99)00003-5.
- [18] A.B. Mathur, A.M. Collinsworth, W.M. Reichert, W.E. Kraus, G.A. Truskey, Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy, *J. Biomech.* 34 (2001) 1545–1553. doi:10.1016/S0021-9290(01)00149-X.
- [19] D.C. Lin, E.K. Dimitriadis, F. Horkay, Robust Strategies for Automated AFM Force Curve Analysis—II: Adhesion-Influenced Indentation of Soft, Elastic Materials, *J. Biomech. Eng.* 129 (2007) 904. doi:10.1115/1.2800826.
- [20] A. Cartagena, A. Raman, Local viscoelastic properties of live cells investigated using dynamic and quasi-static atomic force microscopy methods, *Biophys. J.* 106 (2014) 1033–1043. doi:10.1016/j.bpj.2013.12.037.
- [21] A.F. Guedes, F.A. Carvalho, I. Malho, N. Lousada, L. Sargento, N.C. Santos, Atomic force microscopy as a tool to evaluate the risk of cardiovascular diseases in patients, *Nat. Nanotechnol.* 11 (2016) 687–692. doi:10.1038/nnano.2016.52.
- [22] J.K.F.S. Braz, G.M. Martins, V. Sabino, J.O. Vitoriano, C.A.G. Barboza, A.K.M.C. Soares, H.A.O. Rocha, M.F. Oliveira, C. Alves Júnior, C.E.B. Moura, Plasma nitriding under low temperature improves the endothelial cell biocompatibility of 316L stainless steel, *Biotechnol. Lett.* (2019) 1–8. doi:10.1007/s10529-019-02657-7.
- [23] A.X. Cartagena-Rivera, W.H. Wang, R.L. Geahlen, A. Raman, Fast, multi-frequency, and quantitative nanomechanical mapping of live cells using the atomic force microscope,

Sci. Rep. 5 (2015) 1–11. doi:10.1038/srep11692.

[24] R. Omidvar, M. Tafazzoli-Shadpour, F. Mahmoodi-Nobar, S. Azadi, M.-M. Khani, Quantifying effects of cyclic stretch on cell–collagen substrate adhesiveness of vascular endothelial cells, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 232 (2018) 531–541. doi:10.1177/0954411918767477.

[25] B. Varga, C. Fazakas, I. Wilhelm, I.A. Krizbai, Z. Szegletes, G. Váró, A.G. Végh, Elasto-mechanical properties of living cells., *Biochem. Biophys. Reports.* 7 (2016) 303–308. doi:10.1016/j.bbrep.2016.06.015.

[26] R.A. Abdelrahim, N.A. Badr, K. Baroudi, The effect of plasma surface treatment on the bioactivity of titanium implant materials (in vitro)., *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* 6 (2016) 15–21. doi:10.4103/2231-0762.171592.

[27] J.O. Vitoriano, C. Alves, D.C. Braz, H.A. Rocha, R.C. Lima Da Silva, ScienceDirect In vitro study of platelet behaviour on titanium surface modified by plasma, *Ciência Tecnol. Dos Mater.* 29 (2017) 130–134. doi:10.1016/j.ctmat.2016.09.003.

[28] N. An, A. Schedle, M. Wieland, O. Andrukhov, M. Matejka, X. Rausch-Fan, Proliferation, behavior, and cytokine gene expression of human umbilical vascular endothelial cells in response to different titanium surfaces, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 9999A (2009) NA-NA. doi:10.1002/jbm.a.32539.

[29] M. Kõunõnen, M. Hormia, J. Kivilahti, J. Hautaniemi, I. Thesleff, Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium, *J. Biomed. Mater. Res.* 26 (1992) 1325–1341. doi:10.1002/jbm.820261006.

[30] C. Masaki, G.B. Schneider, R. Zaharias, D. Seabold, C. Stanford, Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression, *Clin. Oral Implants Res.* 16 (2005) 650–656. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01170.x.

[31] C. Michiels, Endothelial cell functions, *J. Cell. Physiol.* 196 (2003) 430–443. doi:10.1002/jcp.10333.

[32] C. James Kirkpatrick, S. Fuchs, M. Iris Hermanns, K. Peters, R.E. Unger, Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine, *Biomaterials.* 28 (2007) 5193–5198. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.08.012.

[33] A.E. Pelling, K. Haase, Investigating cell mechanics with atomic force microscopy., *J. R. Soc. Interface.* 12 (2015) 20140970.

[34] M.J. Harris, D. Wirtz, P.-H. Wu, Dissecting cellular mechanics: Implications for aging, cancer, and immunity, *Semin. Cell Dev. Biol.* (2018). doi:10.1016/j.semcdb.2018.10.008.

[35] E.M. Darling, S. Zauscher, J.A. Block, F. Guilak, A thin-layer model for viscoelastic, stress-relaxation testing of cells using atomic force microscopy: Do cell properties reflect metastatic potential?, *Biophys. J.* 92 (2007) 1784–1791. doi:10.1529/biophysj.106.083097.

[36] M. Chiquet, L. Gelman, R. Lutz, S. Maier, From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793 (2009) 911–920. doi:10.1016/J.BBAMCR.2009.01.012.

- [37] X. Wang, H. Liu, M. Zhu, C. Cao, Z. Xu, Y. Tsatskis, K. Lau, C. Kuok, T. Filleter, H. McNeill, C.A. Simmons, S. Hopyan, Y. Sun, Mechanical stability of the cell nucleus - roles played by the cytoskeleton in nuclear deformation and strain recovery., *J. Cell Sci.* 131 (2018) jcs209627. doi:10.1242/jcs.209627.
- [38] C. Guilluy, L.D. Osborne, L. Van Landeghem, L. Sharek, R. Superfine, R. Garcia-Mata, K. Burrige, Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus, *Nat. Cell Biol.* 16 (2014) 376–381. doi:10.1038/ncb2927.

**CAPÍTULO 04 – COMPORTAMENTO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS
IN VITRO SOBRE SUPERFÍCIES TITÂNIO TRATADAS A PLASMA**

Human endothelial cell behavior in vitro on titanium surfaces treated with plasma

Artigo submetido
Materials Research

Abstract

The process of implant endothelialization is crucial to the success of implants. This work evaluated Ea.hy926 human endothelial cells on plasma-treated titanium. Plasma oxidized titanium surfaces were produced by planar cathode discharge in oxidizing (36O₂ and 24H₂), nitriding (36N₂ and 24H₂) atmospheres. They were characterized for wettability, roughness and chemical composition. Cells were cultured for 4 h on titanium and were observed for adhesion by scanning electron microscopy (SEM), cell morphology by Form Factor (FF), and 24 h viability/proliferation by MTT. Oxidized surface had a lower contact angle (65°) when compared to the nitrided surface (75°). Surface modification stimulated Ea.hy926 adhesion after 4h. After 24h, the cell proliferation on the oxidized surfaces (1.75×10^5) was superior to the nitrided surfaces (1.23×10^5 ; $p < 0.05$). Thus, the titanium plasma oxidation technique had a better in vitro response of Ea.hy926, which favors the endothelialization process and the hemocompatibility of titanium for intravascular devices.

Keywords: Biomaterial, endothelization, Ea.hy926 line cell, plasma.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) are responsible for the highest mortality rate in the world (1); and it is necessary to use an intravascular device in more severe cases (2). However, about 20% of patients treated with these metal devices have problems resulting from restenosis. A dysfunction in the endothelium, the epithelium of blood vessels, which causes blockage of blood flow both by adsorption of plasma proteins and adhesion of platelets to the surfaces (3).

Therefore, the success of an implant is related to its biocompatibility, which means not only the ability of the patient's cells to survive contact with the material (cytocompatibility), but also the hemocompatibility (4). This is a property of the biomaterial when in contact with blood components such as red blood cells, plasma (composed of water and proteins, such as fibrinogen) and platelets (5). Upon contact with blood proteins, the adsorption of the proteins responsible for adhesion, activation and subsequent aggregation of platelets to the formation of thrombi can occur (6). The prevention of platelet thrombi is naturally controlled by endothelial cells. Therefore, rapid endothelialization on metallic surfaces in contact with the

vessel wall can prevent the risks of thrombosis and restenosis(7). Therefore, it is important to improve the hemocompatibility of the surfaces of devices(8).

The modification of the surfaces is a way of improving the properties of the material, mainly the metals and their alloys. Such modification may result in a film on the metal surface which alters the composition and functional structure of the material, promotes cell adhesion, and inhibits oxidation (9). Corrosion releases metallic ions which seep into the surrounding tissues and trigger side effects in the patient (10), from intoxications and allergic processes to inflammatory and infectious conditions which hinder tissue repair and the integration of implants (11). In addition, stainless steel and titanium (Ti) alloys are the most commonly used metals in manufacturing intravascular devices. Titanium and its alloys are widely used in manufacturing implants (12).Ti-O and Ti-N films are used, presenting good compatibility and antithrombotic properties and increase corrosion resistance (8).

The deposition of films for surface modification can be performed by plasma treatment. This is a versatile, safe and low cost alternative, lacking chemical residues and environmental pollutants. In addition, plasma modifies the physicochemical properties and assists in evaluating cell adhesion and proliferation (9,13). The surface of the implant should promote rapid endothelialization and be hemocompatible in order to guarantee vascularization (14). This is a crucial step for successful integration of bone and/or dental implants (mainly intravascular), such as *stents*.

The investigations carried out in this area mainly aim at understanding hemocompatibility and the implications in osseointegration of surfaces, but works on the behavior of endothelial cells on surfaces modified by oxidation and plasma nitriding are scarce. Thus, in this work we evaluated the behavior of the human endothelial cells of the Ea.hy926 strain on titanium surfaces modified to plasma in nitriding and oxidizing atmospheres.

2. Materials and Methods

2.1 Preparation of titanium disks

Titanium discs were 19 mm in diameter and 3 mm thick (grade 2). The surfaces were gradually sanded with silicon carbide (SiC) sieves with different particle sizes of 220, 400, 600, 1500 and 2000 MESH and polished in 40% silica (0.03 μ) and 60% hydrogen peroxide. After this procedure all the disks were immersed in 0.5% enzymatic detergent (*DEIV*) solution in doubly distilled water under ultrasound treatment for 10 minutes. They were subsequently dried and treated by planar cathode discharge in nitriding (36N₂ and 24H₂) and

oxidizing atmosphere (36O_2 and 24H_2). The samples were housed in a 200x300 mm hermetically sealed cylindrical chamber (diameter and height), with an anode (upper region) and a polarized cathode with a power ranging between -400 and -800 V (base region). The discs were submitted to a pressure of 1 mbar in this region at 450°C for 1 hour.

2.2 Characterization of titanium disc surfaces

The average roughness (Ra) of the surfaces were obtained using an Atomic Force Microscope (AFM, SPM 9600, Shimadzu). Wettability was performed by the sessile drop method, measuring the angle formed by a drop of 20 μl of deionized water pipetted on the samples (polished, nitrated and oxidized). The images were captured with a video camera of the goniometer and analyzed with the Suftens program, determining the contact angle values (15).

2.3 Human endothelial cell culture (Ea.hy926)

The human endothelial cell line (Ea.hy926) (CRL-2922™, ATCC) was cultivated in High Glucose DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) and 10% fetal bovine serum (SFB, Cultilab, SP, Brazil), 100 ul/ml penicillin and 100 μg streptomycin (Cultilab, SP, Brazil) and incubated at 37°C in a 5% CO_2 chamber with a change in culture medium every 48 hours.

2.4 Morphology of human endothelial cells (Ea.hy926)

The cells were cultured at the concentration of 5×10^4 cells on the titanium: polished, nitrated and oxidized discs in triplicate for 4 hours. They were then fixed with 4% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer and pH 7.2 (PBS) for 4 h. The disks were washed with PBS to remove non-adherent cells, post-fixed with 1% osmium tetroxide in phosphate buffer for 1 h and dehydrated in increasing concentrations of ethanol. The samples were coated with gold and visualized in a scanning electron microscope (SEM). Images captured by SEM were analyzed in Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA). The morphology of the endothelial cells was quantified by the Form Factor (FF), which consists of the product of the division between area and cellular perimeter: $\text{FF} = (\text{area}/\text{perimeter}^2) \times 4\pi$ (16).

2.5 Viability of human endothelial cells (Ea.hy926)

The discs of polished, nitrided and oxidized titanium were placed in 12-well plates with the concentration of 5×10^4 cells/disc in triplicate. After 24 hours of incubation, a solution of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was added to the specific culture medium per well and maintained in the CO₂ incubator at 37 for 4 hours. The MTT crystals were dissolved with the addition of P.A. ethyl alcohol. Samples were taken to a microplate reader (Quant MKX200, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) for absorbance spectrophotometry at 570 nm. The amount of cells was determined from a standard growth curve (24h) of the Ea.hy926 cell line.

2.6 Statistical analysis

The analyzes of surface characterization (roughness and wettability), as well as the cellular form factor were analyzed by One-Way ANOVA followed by multiple comparisons test. Cell viability was evaluated by the One-tailed Student's t-test ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

Plasma is capable of improving the tribological properties of titanium (friction, lubrication and wear) (17). In addition, treating the titanium surface can modify its chemical composition, roughness and wettability. Such aspects may aid in predicting successful implantation when in contact with biological material, such as endothelial cells. Therefore, this work evaluated the effects of nitriding and plasma oxidation on titanium surfaces. Plasma treatment promoted the incorporation of nitrogen and oxygen in the titanium surfaces according to XRD analysis (Figure 1).

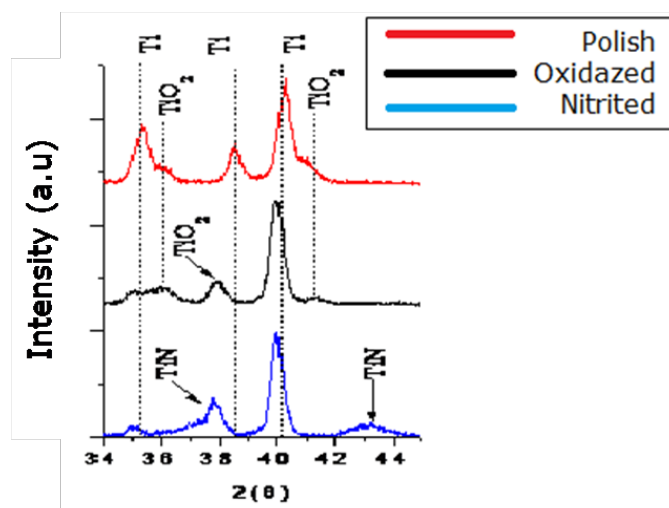


Figure 1 - Diffractogram of titanium surface treated with plasma at the contact angle of 20.

The roughness of the surfaces is shown in Figure 2 (A-F). Plasma nitriding significantly increased the surface roughness (Ra) of the titanium surface (27.72 ± 1.3 nm; $p < 0.05$) when compared to polished (1.3 ± 0.2 nm; $p < 0.05$) and oxidized surfaces (10.28 ± 1.1 nm, $p < 0.05$) (Table 1). Although it is well argued that roughness and the presence of peaks stimulate the proliferation and differentiation of pre-osteoblastic cells, there is not much information about their influence on endothelial cells(18). However, the generation of different TiO_2 patterns by nanomodification of the titanium surfaces induced the proliferation and migration of endothelial cells into stents(19). Therefore, the use of plasma in nitriding atmosphere for titanium can offer good results in bone implants and the oxidant for intravascular devices.

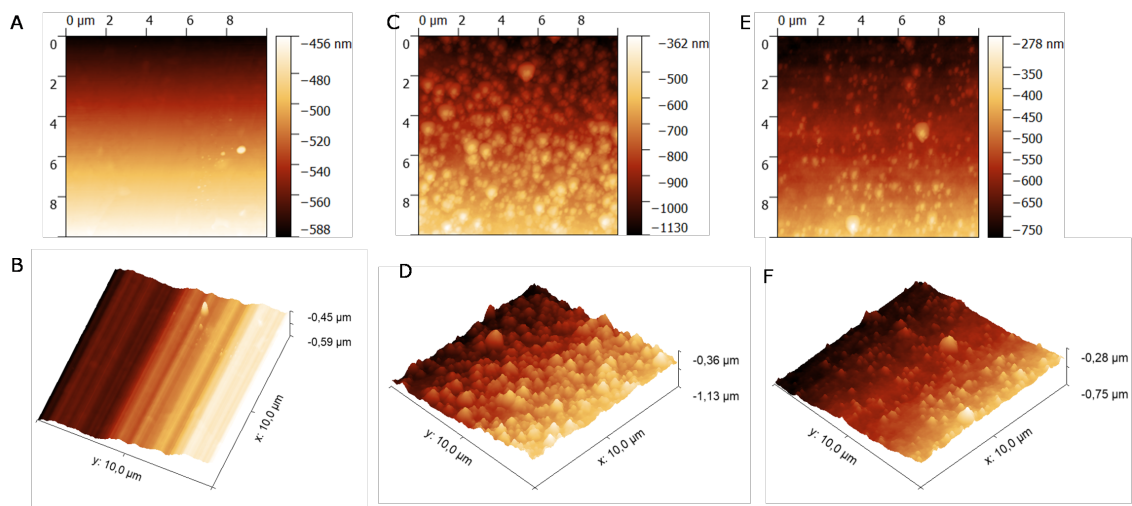


Figure 2 -Nanotopography of titanium by atomic force microscopy. (A-B) Polished titanium surface. (C-D) Nitrided titanium Surface. (E-F) Oxidized titanium surface. Area = 10x10 μ m.

Table 1 – Roughness parameters (nm) of the titanium surfaces.

Surface	Ra	Rp	Rz	Rp/Rz
Polish	$1,3 \pm 0,2^a$	$6,84 \pm 0,2^a$	$9,88 \pm 0,9^a$	$0,7 \pm 0,1$
Nitrited	$27,72 \pm 1,3^b$	$140,14 \pm 23,5^b$	$176,50 \pm 78,9^b$	$1.89 \pm 2,5$

Oxidized	$10,28 \pm 1,1^c$	$62,98 \pm 13,0^c$	$95,86 \pm 21,8^c$	0.67 ± 0.6
----------	-------------------	--------------------	--------------------	----------------

Different letters (p<0,001).

The result of the ratio between the peak height (Rp) and the maximum height of the roughness profile (Rz) establishes the shape of the peaks. This variation in the roughness profile of the surfaces modulates the mechanotransduction (intracellular signals) of the cell, which directly implies its physiology and the success of the implant (20,21). Thus, the surface profile will be pointed if the product of Rp/Rz is > 0.5 , and rounded when the Rp/Rz ratio is < 0.5 (22). Plasma nitriding formed a roughness profile with more pointed peaks (1.89 ± 2.5 ; $p > 0.05$) in relation to the oxidized surface (0.67 ± 0.6 ; $p > 0.05$) (Table 1). This increase in the Rp/Rz ratio by nitriding on titanium surfaces elevated platelet activation (23). Therefore, the presence of more rounded peaks produced by the oxidized surface favors the hemointegration of this surface.

Cell adhesion may be related to other physical properties of the surface, such as hydrophilicity (18). The oxidized surface is hydrophilic, since it presented a lower contact angle (65°) when compared to the nitrided surface (75°). According to Ponsonnet et al.(24),titanium surfaces that have contact angles between 50° and 65° have less roughness, better adhesion and proliferation of fibroblasts. In addition, the increase in hydrophilicity after titanium treatment by atmospheric plasma increased adhesion and positively implicated in the migration and proliferation of human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC) (25), since a hydrophilic surface favors the adsorption of proteins leading to an improvement in the hemocompatibility of this material (26).

Endothelial cells adhered after 4h on all surfaces, however with a distinct cell format (Figure 3). The shape factor in the polished titanium (0.23 ± 0.38 , $p > 0.05$) and on the TiO₂ surface (0.08 ± 0.04 ; $p > 0.05$) indicates that there is a predominance of adhered cells with irregular and starred morphology, marked by prolongations which aid in cell recruitment and proliferation on the surface (Figure 3A-B'). In TiN₂, the form factor coefficient (0.42 ± 0.7 ; $p > 0.05$) implies cells with an elliptical shape, but with few extensions (Figure 3C-C).

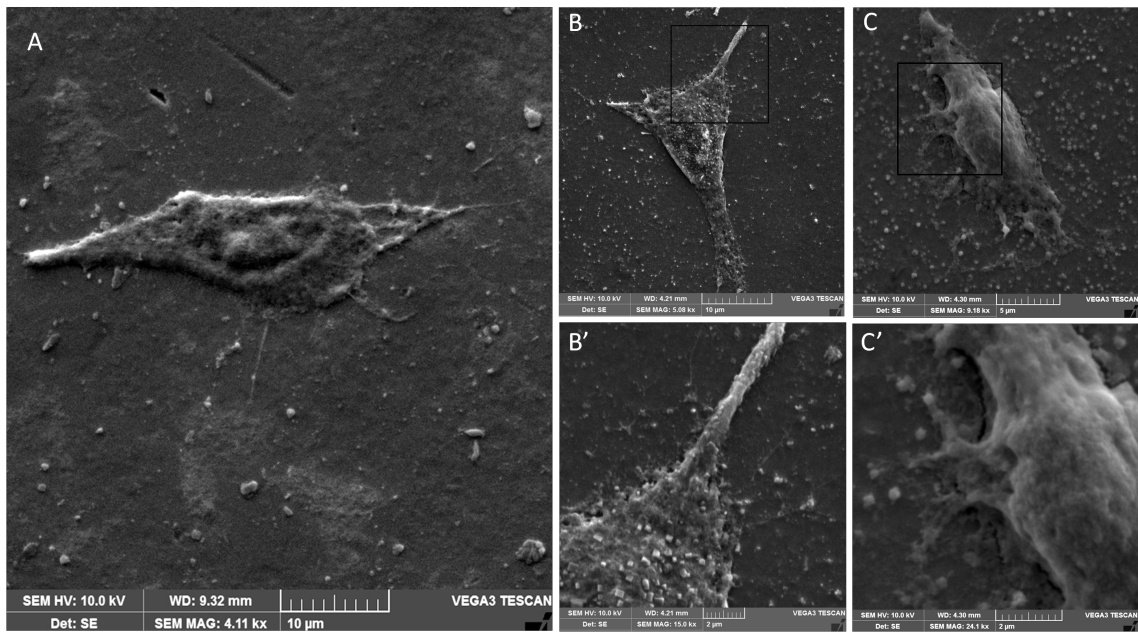


Figure 3-Scanning electron microscopy of Ea.hy926 cells grown on polished and plasma-treated titanium disc. (A) Ea.hy926 grown on the polished surface with star-like morphology. (B) Ea.hy926 grown on plasma oxidized titanium surface with star-shaped morphology. (B') Emission of the cytoplasmic extensions on TiO₂. (C) Ea.hy926 grown on TiN₂ surface with elliptic morphology. (C') Details of the anchoring on plasma nitrided titanium.

The cell adhesion process to the surface is crucial and acts directly in the cell growth, migration and differentiation processes (25). In our study, the TiO₂ surface significantly increased the proliferation of viable cells 24h after treatment ($1.75 \times 10^5 \pm 3.0 \times 10^4$ cells; $p < 0.05$) when compared to TiN₂ surface ($1.23 \times 10^5 \pm 2.3 \times 10^4$ cells, $p < 0.05$) (Figure 4). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) also showed better adhesion and proliferation results on low roughness TiO₂ surfaces (27). Furthermore, the study by Vitoriano et al. (2017) also suggest that the absence of nitrogen-containing titanium, consisting solely of argon and hydrogen, exhibits antithrombocytopenic activity. This condition is essential for producing a good intravascular implant.

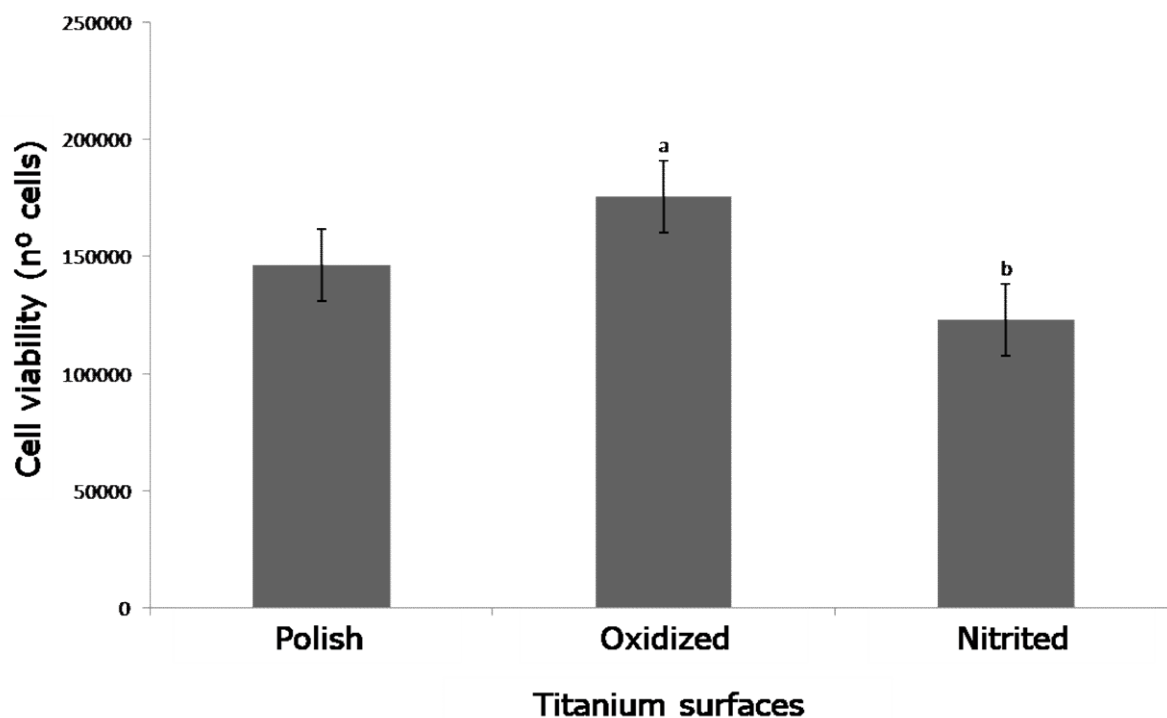


Figure 4 -Cell viability by MTT after 24 hours of culture in contact with polished, oxidized and nitrided disc. Different letters ($p < 0.05$).

Conclusion

In spite of using the same concentrations, the different gases modified the surface and influenced the human endothelial cells in a different way. The use of plasma under an oxygen atmosphere improved the physical and functional properties of titanium by improving the endothelialization process. On the other hand, nitriding produced a surface with nanoscale roughness, which although does not have toxic effects on the endothelial cells, can offer better results in the osseointegration process.

References

1. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2017 Jul 17 [cited 2019 Feb 8];70(1):1–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109717372443>
2. Dziejewicz A, Dudek D. Current perspectives on the role of bioresorbable scaffolds in the management of coronary artery disease. *Kardiologia Polska* [Internet]. 2018 Jul 6 [cited 2019 Feb 7];76(7):1043–54. Available from: <https://ojs.kardiologiapolska.pl/kp/article/view/12378>
3. Nuhn H, Blanco CE, Desai TA. Nanoengineered Stent Surface to Reduce In-Stent Restenosis *in Vivo*. *ACS Appl Mater Interfaces* [Internet]. 2017 Jun 14 [cited 2019 Feb 8];9(23):19677–86. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.7b04626>
4. Murray PE, Godoy CG, Godoy FG. How is the biocompatibility of dental biomaterials

- evaluated? [Internet]. Vol. 12, *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* (Internet). Medicina Oral Place of publication not identified; 2004 [cited 2019 Feb 18]. 258–266 p. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462007000300017
5. Rajan A, Sivarajan S, Vallabhan CG, Nair AS, Jayakumar S, Pillai AS. An In Vitro Study to Evaluate and Compare the Hemocompatibility of Titanium and Zirconia Implant Materials after Sandblasted and Acid-etched Surface Treatment. *J Contemp Dent Pract* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2019 Feb 18];19(12):1448–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30713172>
 6. Braune S, Hönow A, Mrowietz C, Cui J, Kratz K, Hellwig J, et al. Hemocompatibility of soft hydrophobic poly(n-butyl acrylate) networks with elastic moduli adapted to the elasticity of human arteries. *Clin Hemorheol Microcirc* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2019 Feb 19];49(1–4):375–90. Available from: <https://content.iospress.com/articles/clinical-hemorheology-and-microcirculation/ch1487>
 7. Liu H, Pan C, Zhou S, Li J, Huang N, Dong L. Improving hemocompatibility and accelerating endothelialization of vascular stents by a copper-titanium film. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2019 Feb 18];69:1175–82. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116308062?via%3Dihub>
 8. Huang N, Yang P, Leng YX, Chen JY, Sun H, Wang J, et al. Hemocompatibility of titanium oxide films. *Biomaterials* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2019 Feb 18];24(13):2177–87. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203000462>
 9. Mozetič M, Mozetič, Miran. Surface Modification to Improve Properties of Materials. *Materials (Basel)* [Internet]. 2019 Jan 31 [cited 2019 Feb 8];12(3):441. Available from: <http://www.mdpi.com/1996-1944/12/3/441>
 10. Banaszek K, Wiktorowska-Owczarek A, Kowalczyk E, Klimek L. Possibilities of applying Ti (C, N) coatings on prosthetic elements - research with the use of human endothelial cells. *Acta Bioeng Biomech* [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 18];18(1):129–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27150700>
 11. Volstad N, Schaefer S, Snyder L, Meinen J, Sample S. Metallosis with pseudotumour formation: Long-term complication following cementless total hip replacement in a dog. *Vet Comp Orthop Traumatol* [Internet]. 2016 Jul 17 [cited 2019 May 28];29(04):283–9. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.3415/VCOT-16-02-0028>
 12. Borhani S, Hassanajili S, Ahmadi Tafti SH, Rabbani S. Cardiovascular stents: overview, evolution, and next generation. *Prog Biomater* [Internet]. 2018 Sep 10 [cited 2019 Feb 7];7(3):175–205. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40204-018-0097-y>
 13. Alves C, Guerra Neto CLB, Morais GHS, da Silva CF, Hajek V. Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 2006 Mar 15 [cited 2018 Nov 9];200(11):3657–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0257897205008030>
 14. Recek N. Biocompatibility of Plasma-Treated Polymeric Implants. *Materials (Basel)* [Internet]. 2019 Jan 12 [cited 2019 Feb 8];12(2):240. Available from: <http://www.mdpi.com/1996-1944/12/2/240>
 15. Moura CEB, Silva NB, Sa JC, Cavalcanti GB, de Medeiros SRB, Rocha HAO, et al. MC3T3-E1 Cells Behavior on Surfaces Bombarded by Argon Ions in Planar Cathode Discharge. *Artif Organs* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2018 Nov 12];40(5):497–504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/aor.12597>

16. Shah A., Sinha R., Hickok N., Tuan R. High-resolution morphometric analysis of human osteoblastic cell adhesion on clinically relevant orthopedic alloys. *Bone* [Internet]. 1999 May 1 [cited 2018 Nov 9];24(5):499–506. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328299000770>
17. Kang J, Wang M, Yue W, Fu Z, Zhu L, She D, et al. Tribological Behavior of Titanium Alloy Treated by Nitriding and Surface Texturing Composite Technology. *Mater (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2019 Jan 18 [cited 2019 Feb 5];12(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30669339>
18. Lagonegro P, Trevisi G, Nasi L, Parisi L, Manfredi E, Lumetti S, et al. Osteoblasts preferentially adhere to peaks on micro-structured titanium. *Dent Mater J* [Internet]. 2018 Mar 26 [cited 2019 Feb 5];37(2):278–85. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmj/37/2/37_2017-008/_article
19. Mohan CC, Sreerekha PR, Divyarani V V., Nair S, Chennazhi K, Menon D. Influence of titania nanotopography on human vascular cell functionality and its proliferation in vitro. *J Mater Chem* [Internet]. 2012 Dec 20 [cited 2019 Feb 5];22(4):1326–40. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C1JM13726C>
20. Teo BKK, Wong ST, Lim CK, Kung TYS, Yap CH, Ramagopal Y, et al. Nanotopography Modulates Mechanotransduction of Stem Cells and Induces Differentiation through Focal Adhesion Kinase. *ACS Nano* [Internet]. 2013 Jun 25 [cited 2019 Feb 5];7(6):4785–98. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/nm304966z>
21. Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Mar 16 [cited 2019 Feb 5];107(11):4872–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194780>
22. Whitehead SA, Shearer AC, Watts DC, Wilson NHF. Comparison of methods for measuring surface roughness of ceramic. *J Oral Rehabil.* 1995;22(6):421–7.
23. Vitoriano JO, Alves C, Braz DC, Rocha HA, Lima Da Silva RC. ScienceDirect In vitro study of platelet behaviour on titanium surface modified by plasma. *Ciência Tecnol dos Mater* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jan 11];29:130–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctmat.2016.09.003>www.sciencedirect.com<http://ees.elsevier.com/ctmat>
24. Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2003 Jun 10 [cited 2019 Feb 5];23(4):551–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092849310300033X>
25. Shim JW, Bae I-H, Park DS, Lee S-Y, Jang E-J, Lim K-S, et al. Hydrophilic surface modification of coronary stent using an atmospheric pressure plasma jet for endothelialization. *J Biomater Appl* [Internet]. 2018 Mar 19 [cited 2019 Feb 6];32(8):1083–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29256322>
26. Nan H, Ping Y, Xuan C, Yongxang L, Xiaolan Z, Guangjun C, et al. Blood compatibility of amorphous titanium oxide films synthesized by ion beam enhanced deposition. *Biomaterials* [Internet]. 1998 Apr 1 [cited 2019 Feb 18];19(7–9):771–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961298002129>
27. Chen JY, Tian RL, Leng YX, Yang P, Wang J, Wan GJ, et al. Effect of Ar plasma etching of Ti–O film surfaces on biological behavior of endothelial cell. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 2007 Apr 23 [cited 2019 Feb 19];201(15):6901–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0257897206010760>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de dispositivos intravasculares requer a utilização de biomateriais metálicos biocompatíveis reduzindo os riscos de rejeição, oxidação e na promoção morfofuncional do endotélio vascular. Para tanto são necessárias pesquisas *in vitro* para compreender os mecanismos celulares (em modelo animal e humano). Esses modelos auxiliam na visualização dos mecanismos utilizados para adaptação em superfícies metálica de contato, já que não é possível no ambiente *in vivo*. Mediante os resultados é possível realizar o planejamento dos testes pré-clínicos em animais cuja resposta se assemelha aos humanos, bem como reduzir o número de animais e os custos, de forma segura e significativa. Logo, nossa pesquisa confirmou que as células endoteliais humanas da linhagem (Ea.hy926) apresentou resposta semelhante as células endoteliais da aorta do coelho (RAEC) sobre as superfícies tratadas de titânio. Dessa forma, o coelho pode ser considerado um modelo seguro para testes *in vivo* das superfícies produzidas.

A produção das superfícies metálicas nitretada (titânio e aço inoxidável) e oxidada (titânio) com rugosidade nanométrica foi caracterizada e apresentou aumento da molhabilidade após o tratamento a plasma, o que promoveu melhor adsorção das proteínas e posterior adesão. Todas as superfícies conseguiram incorporar o nitrogênio e oxigênio, respectivamente, em sua composição química de maneira uniforme e segura. Os perfis de rugosidade da superfície nitretada foram distintos das superfícies oxidadas. A nitretação forma maior quantidade de picos com distribuição homogênea. Já a oxidação formou menor rugosidade, e conseqüentemente, menor quantidade de picos. Essas propriedades em cada material influenciaram as respostas a nível celular.

As células endoteliais da aorta do coelho e humana apresentaram morfologia, adesão e viabilidade celular semelhante quando cultivadas sobre as superfícies de titânio nitretadas e oxidadas. Assim como, em ambas as linhagens foram obtidas os melhores resultados sobre a superfície de titânio oxidada, por isso recomendam-se a utilização desse tratamento para o desenvolvimento de *stents*. Já as superfícies titânio nitretada nessa condição de plasma por possuir uma distribuição de picos mais homogênea favoreça a osseointegração, sendo por tanto utilizada com outra finalidade. Contudo, a utilização de nitretação a plasma em aço inoxidável a 450°C não promoveu a oxidação desse material. Essa resposta foi favorável e implicou em aumento significativo da viabilidade das RAEC. Esse trabalho demonstrou que a condição da nitretação de plasma em cátodo planar pode variar conforme o material utilizado. Além disso, foi possível estabelecer que as células endoteliais da aorta do

coelho podem ser utilizadas como modelo seguro para teste de biocompatibilidade de superfícies metálicas tratadas a plasma. Já que a RAEC possui a resposta morfofuncional semelhante as das células endoteliais humanas sobre as superfícies.

Os tratamentos a plasma utilizados nesse trabalho aumentaram o potencial biocompatível das superfícies. Para compreender como essa resposta aconteceu foi realizada a caracterização da viscoelasticidade nuclear e da periferia das células endoteliais (RAEC) das sobre as superfícies metálicas de titânio tratadas a plasma. O aumento da rigidez da periferia celular quando em contato com superfície nitretada, possivelmente induziu a produção de matriz celular para aumentar a adesão e induzir a proliferação. Esses resultados implicam na redução da viabilidade celular quando comparada ao obtido com as superfícies oxidadas. Na superfície oxidada a redução dos picos, favoreceu redução da rigidez da periferia celular sobre a superfície, o que facilitou a adesão e o aumento da viabilidade celular. Dessa forma, esse método corrobora com os achados anteriores para essas células sobre a superfície, e pode ser um método inovador para visualizar o comportamento celular e auxiliar na caracterização dos biomateriais.

Assim, esse trabalho após avaliar a morfologia, adesão, proliferação e comunicação de células endoteliais humanas e da aorta de coelhos cultivadas em superfícies metálicas modificadas a plasma, recomenda a utilização de titânio oxidado e aço inoxidável nitretado para o desenvolvimento, posterior de ensaios *in vivo* no modelo de coelho para dispositivos intravasculares. Além disso, após análise dos resultados é indicada a realização de testes *in vitro* com as superfícies de titânio nitretada, nesta condição de plasma, com células osteoblásticas.

REFERÊNCIAS

- ABDAL-HAY, A.; HUSSEIN, K.H.; CASETTARI, L.; KHALIL, K.A.; HAMDY, A.S. Fabrication of novel high performance ductile poly (lactic acid) nanofiber scaffold coated with poly (vinyl alcohol) for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, p.143-150, 2016.
- ALBREKTSSON, T. Direct bone anchorage of dental implants. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 50, n. 2, p.255-261, 1983.
- ALVES JR, C. Nitretação a plasma: fundamentos e aplicações. EDUFRN, 2001.
- ALVES, C.; NETO, C.G.; MORAIS, G.H.S.; SILVA, C.F.; HAJEK, V. Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge. **Surface and Coatings Technology**, v. 194, n. 2, p.196-202, 2006.
- ALVES JÚNIOR, C.; ARAÚJO, O.F.; SOUSA, M.D.R.R. Comparison of plasma-assisted nitriding techniques. **Encyclopedia of Tribology**, p.402-410, 2013.
- ALVES JÚNIOR, C.; FREITAS, N.V.D.S.; MORAIS, P.B.D.; VITORIANO, J.D.O. Changing the characteristics of the nitrided layer using three different plasma configurations. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 24, n. 2, p.1-8, 2019.
- AIRES, M. M.; TRETER, J.; NUNES FILHO, A.; NASCIMENTO, I.O.; MACEDO, A.J.; ALVES JÚNIOR, C. Minimizing Pseudomonas aeruginosa adhesion to titanium surfaces by a plasma nitriding process. **AIMS Biophysics**, v. 4, p.19-32, 2016.
- AZELOGLU, E.U.; COSTA, K.D. Atomic force microscopy in mechanobiology: measuring microelastic heterogeneity of living cells. In: *Atomic Force Microscopy in Biomedical Research*. Humana Press, pp. 303-329, 2011.
- BACHETTI, T.; MORBIDELLI, L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. **Pharmacological Research**, v. 42, n. 1, p.9-19, 2000.
- BALABAN, N.Q.; SCHWARZ, U.S.; RIVELINE, D.; GOICHBERG, P.; TZUR, G.; SABANAY, I.; MAHALU, D.; SAFRAN, S.; BERSHADSKY, A.; ADDADI, L; GEIGER, B. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. **Nature cell biology**, v. 3, n. 5, p.466-472, 2001.
- BEDER, O.E.; PLOGER, W.J. Intraoral titanium implants. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 12, n. 7, p.787-799, 1959.
- BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy—from birth to adolescence. **Reviews of Modern Physics**, v. 59, n. 3, p.615, 1987.
- BORDJI, K.; JOUZEAU, J.Y.; MAINARD, D.; PAYAN, E.; NETTER, P.; RIE, K.T.; STUCKY, T.; HAGE-ALI, M. Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5 Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. **Biomaterials**, v. 17, n. 9, p. 929-940, 1996

BOLETIM BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIAS EM SAÚDE (BRATS). Stents farmacológicos e stents metálicos no tratamento da doença arterial coronariana. n.8, p.1-22, 2009.

BOUÏS, D., HOSPERS, G.A., MEIJER, C., MOLEMA, G., MULDER, N.H. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. **Angiogenesis**, v. 4, n. 2, p. 91-102, 2001.

BREITHAUPT-FALOPPA, A.C.; KLEINHEINZ, J.; CRIVELLO, O. 2006. Endothelial cell reaction on a biological material. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 76, n. 1, p.49-55.

BRUNETTE, D.M. Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses, and Medical Applications. **Springer Science & Business Media**, 2001.

BUONASSISI, V.; VENTER, J.C. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 5, p.1612-1616, 1976.

CÁRDENAS-PÉREZ, S.; CHANONA-PÉREZ, J.J.; MÉNDEZ-MÉNDEZ, J.V.; ARZATE-VÁZQUEZ, I.; HERNÁNDEZ-VARELA, J.D.; VERA, N.G. Recent advances in atomic force microscopy for assessing the nanomechanical properties of food materials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 87, p.59-72, 2019.

CARDOSO, C. O. et al Perfil de uso dos stents farmacológicos no Brasil: dados da Central Nacional de Intervenções Cardiovasculares (CENIC). **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 89, n. 6, p.356-61, 2007

CARTAGENA, A.; RAMAN, A. Local viscoelastic properties of live cells investigated using dynamic and quasi-static atomic force microscopy methods. **Biophysical Journal**, v. 106, n. 5, 1033-1043, 2014.

CARTAGENA-RIVERA, A. X.; WANG, W. H.; GEAHLEN, R. L.; RAMAN, A. Fast, multi-frequency, and quantitative nanomechanical mapping of live cells using the atomic force microscope. **Scientific Reports**, v. 5, p. 11692, 2015.

CHRISTENSON, L.K.; STOUFFER, R.L. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from the primate corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1397-1404, 1996.

CINES ,D.B.; POLLAK ES, BUCK, C.A.; LOSCALZO, J.; ZIMMERMAN, G.A.; MCEVER, R.P.; POBER, J.S.; WICK, T.M.; KONKLE, B.A.; SCHWARTZ, B.S.; BARNATHAN, E.S.; MCCRAE, K.R.; HUG, B.A.; SCHMIDT, A.M.; STERN, D.M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**. v. 91, p. 3527–3561, 1998.

DISCHER, D. E.; JANMEY, P.;WANG, Y. L.. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. **Science**. 310:1139–1143.

EDGELL, C. J.; MCDONALD, C.C.; GRAHAM, J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 12, p.3734-3737, 1983.

FRANÇA, L.H.G.; PEREIRA, A.H. Atualização sobre endopróteses vasculares (stents): dos estudos experimentais à prática clínica. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 7, n. 4, p.351-363, 2008.

FERRAZ, E. P.; SVERZUT, A. T.; FREITAS, G. P. et al. (Bone tissue response to plasma-nitrided titanium implant surfaces. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 1, p. 9-13, 2015.

FINN, A.V.; NAKAZAWA, G.; JONER, M.; KOLODZIE, F.D.; MONT, E.K.; GOLD, H.K.; VIRMANI, R. Vascular responses to drug eluting stents. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 7, p.1500-1510, 2007.

GALLAGHER, G.L.; SUMPIO, B.E. Endothelial cells. **The Basic Science of Vascular Disease**, p.151-186, 1997.

GORRIERI, O.; FINI, M.; KYRIAKIDOU, K. et al. In vitro evaluation of bio-functional performances of Ghimas titanium implants. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 29, n. 10, p. 1012-1020, 2006.

GRECH, E. D. ABC of interventional cardiology: percutaneous coronary intervention. I: history and development. **BMJ**, v.326, n.7398, p.1080-2, 2003.

GUEDES, A.F.; FILOMENA, A.C.; INÊS MALHO, N.L.; SARGENTO, L.;SANTOS, N.C. Atomic force microscopy as a tool to evaluate the risk of cardiovascular diseases in patients. **Nature Nanotechnology**, v. 11, n. 8, 687-692, 2016.

GUO, Q.; XIE, Y.; WANG, X.; LV, S.; HOU, T.; BAI, C. Synthesis of uniform titanium nitride nanocrystalline powders via a reduction–hydrogenation–dehydrogenation–nitridation route. **Journal of the American Ceramic Society**, v, 88, n. 1, p.249-251, 2005.

HOH, J.H.; SCHOENENBERGER, C.A. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 5, p.1105-1114, 1994.

HONG, C.; TIE-SUO, D.; JUN, L.; XUE-SHAN, X.; JUN-LIANG, Z.; LAI-ZHU, J. A. New Economical Sigma-Free Duplex Stainless Steel 19Cr-6Mn-1.0Mo-0.5Ni-0.5W- 0.5Cu-0.2N, **Journal of Iron and Steel Research International**, vol. 18(4), p. 52-57, 2011.

IACCARINO, G.; CICCARELLI, M.; SORRIENTO, D. et al. AKT participates in endothelial dysfunction in hypertension. **Circulation**, v. 109, p. 2587–2593, 2004.

INGBER, D. E. 1997. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. **Annu. Rev. Physiol.** 59:575–599.

JAFFE, E.A.; NACHMAN, R.L.; BECKER, C.G.; MINICK, C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 11, p.2745, 1973

KASAS, S.; STUPAR, P.; DIETLER, G. AFM contribution to unveil pro-and eukaryotic cell mechanical properties. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 73, p. 177-187, 2018.

KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. A decade of progress in tissue engineering. **Nature Protocols**, v. 11, n. 10, p; 1775-1781, 2016.

KIESWETTER, K.; SCHWARTZ, Z.; HUMMERT, T.W.; COCHRAN, D.L.; SIMPSON, J.; DEAN, D.D.; BOYAN, B.D. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 32, n. 1, p.55-63, 1996.

KITE, G.L; CHAMBERS, R., J.R. Vital staining of chromosomes and the function and structure of the nucleus. **Science**, v. 36, n. 932, p. 639–641, 1912.

KOCH, S.; BUSCHER, R.; TIKHOVSKI, I.; BRAUER, H.; RUNIEWISZCZ, A.; DUDZINSKI, W; FISCHER, A. Mechanical, chemical and tribological properties of nickel-free high nitrogen steel X13CrMnMoN18-14-3, **Materialwissenschaft und werkstofftec**, vol. 33, p. 705-715, 2002.

KOMOROWSKI, P.; WALKOWIAK-PRZYBYŁO, M.; WALKOWIAK, B. Early cell response to contact with biomaterial's surface. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 104, n. 5, p.880-893, 2016.

KULKARNI, M.; MAZARE, A.; SCHMUKI, P.; IGLIČ, A. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. **Nanomedicine**, v. 111, p.111-136, 2014.

LANDMANN, M.; RAULS, E; SCHMIDT, W.G. The electronic structure and optical response of rutile, anatase and brookite TiO₂. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 24, n. 19, p.195503, 2012.

LEWIS, W.H., Smooth muscle and endothelium in tissue culture. **Anatomical Records**, v. 21, p.72, 1921.

LI, C.X.; BELL, T. Corrosion properties of active screen plasma nitrided 316 austenitic stainless steel. **Corrosion Science**, v. 46, n. 6, p. 1527-1547, 2004.

LIN, L. H.; CHEN, S. C.; WU, C. Z.; HUNG, J. M.; OU, K. L. Microstructure and antibacterial properties of microwave plasma nitrided layers on biomedical stainless steels. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 17, p. 7375-7380, 2011.

LIPPOLD, J.C.; KOTECKI, D.J. Welding metallurgy and weldability of stainless steels. **Welding Metallurgy and Weldability of Stainless Steels**, by John C. Lippold, Damian J. Kotecki, p. 376, 2005.

LIU, X.; CHU, P.K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 47, n. 3, p.49-121, 2004.

LO, K.H.; SHEK, C.H.; LAI, J.K.L. Recent developments in stainless steels. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 65, p. 39–104, 2009.

LOBATO, A.C. Stents vasculares. In: Lobato AC. **Cirurgia endovascular**. São Paulo: Instituto de Cirurgia Vascular e Endovascular de São Paulo, p. 83-96, 2006.

LOKESHWAR, V.B.; IIDA, N.; BOURGUIGNON, L.Y. The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p.23853-23864, 1996

MARUYAMA, Y. The human endothelial cell in tissue culture. **Cell and Tissue Research**, v. 60, n. 1, p. 69-79, 1963.

MARX, B.; MARX, C.; MARX, R.; REISGEN, U. A.; WIRTZ, D.C. Bone cement adhesion on ceramic surfaces—Surface activation of retention surfaces of knee endoprostheses by atmospheric pressure plasma vs. thermal surface treatment. **Journal of Advanced Ceramics**, v. 5, n. 2, pp.137-144, 2016.

McGUIRE, M., **Stainless Steels for Design Engineers**, American Society for Metals International, Materials Park, Ohio, 285 p., 2008

MONTELL, D. J. 2008. Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties. **Science**, v. 322, p. 1502–1505.

MOLITOR, P.; BARRON, V.; YOUNG, T. Surface treatment of titanium for adhesive bonding to polymer composites: a review. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 21, n. 2, p. 129-136, 2001.

MOURA, C.E.B.; QUEIROZ NETO, M.F.; BRAZ, J.K.F.; AIRES, M.; SILVA FARIAS, N.B.; BARBOZA, C.A.G.; CAVALCANTI JÚNIOR, G.B.; ROCHA, H.A.O; ALVES JUNIOR, C. Effect of plasma-nitrided titanium surfaces on the differentiation of pre-osteoblastic cells. **Artificial organs**, 2019.

MOURA, C. E. B.; SILVA, N. B.; SA, J. C. et al. MC3T3-E1 Cells Behavior on Surfaces Bombarded by Argon Ions in Planar Cathode Discharge. **Artificial organs**, v. 40, n. 5, p. 497-504. 2016.

NAHA, S.K. Stainless Steel: The Green Alloy. **Science Report**. p. 52-55, 2011.

NIINOMI, M. Recent metallic materials for biomedical applications, **Metallurgical and Materials Transactions A**, v. 33A, p. 477-486, 2002.

NIINOMI, M.; NAKAI, M; HIEDA, J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. **Acta Biomaterialia, article in press**, v. 8, n.11, p.3888-3903. 2012.

NORTHEN, H.T. Alterations in the structural viscosity of protoplasm by colchicine and their relationship to c-mitosis and c-tumor formation. **American Journal of Botany**, v. 37, n. 9, p. 705–711, 1950.

NUNES, C.; TEIXEIRA, V.; PRATES, M.L.; BARRADAS, N.P.; SEQUEIRA, A.D. Graded selective coatings based on chromium and titanium oxynitride. **Thin Solid Films**, v. 442, n. 1, p.173-178, 2003.

NELKEN, N.; SCHNEIDER, P.A. Advances in stent technology and drug-eluting stents. **Surgical Clinics of North America** v. 84, p. 1203-1236, 2004

PADILHA, A. F.; RIOS, P. R. Decomposition of austenite in austenitic stainless Steels, **ISIJ International**, v. 42, n. 4, p. 325-337, 2002

ROBERGE, P.R., Handbook of Corrosion Engineering. McGraw-Hill Handbooks, p.1-54. 2000.

RONDAIJ, M.G.; BIERINGS, R.; KRAGT, A.; VAN MOURIK, J. A.; VOORBERG, J. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 5, p.1002-1007, 2006.

ROTH, G.A.; JOHNSON, C.; ABAJOBIR, A.; ABD-ALLAH, F.; ABERA, S.F.; ABYU, G.; AHMED, M.; AKSUT, B.; ALAM, T; ALAM, K.; ALLA, F. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 1, p.1-25, 2017.

SÁ, J. C.; DE BRITO, R. A.; MOURA, C. E.; SILVA, N. B.; ALVES, M.; JÚNIOR, C. A. Influence of argon-ion bombardment of titanium surfaces on the cell behavior. **Surface and Coatings Technology**, v. 203, n. 13, p. 1765-1770, 2009.

SAKAMOTO, A.; JINNOUCHI, H.; TORII, S.; VIRMANI, R.; FINN, A. Understanding the Impact of Stent and Scaffold Material and Strut Design on Coronary Artery Thrombosis from the Basic and Clinical Points of View. **Bioengineering**, v. 5, n. 3, p.71, 2018.

SANTOS, MI; FUCHS S; GOMES ME; UNGER RE; REIS RL; KIRKPATRICK CJ. Response of micro- and macrovascular endothelial cells to starch-based fiber meshes for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 28, n. 2, p. 240-248, 2007.

SANTOS, K.H.; FERREIRA, J.A.; OSIRO, D.; CONCEIÇÃO, G.J.A.; COLNAGO, L.A.; ALVES JÚNIOR, C.; PALLONE, E.M.D.J.A. Plasma surface treatments of Al₂O₃/ZrO₂ nanocomposites and their influence on the formation and adhesion of calcium phosphates. **Applied Surface Science**, v. 456, p. 552-560, 2018

SANTULLI, G; WRONSKA A; URYU K, et al. A selective microRNA-based strategy inhibits restenosis while preserving endothelial function. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, p. 4102–4114, 2014.

SATYANARAYANA, V.V; MADHUSUDHAN REDDY, G.; MOHANDAS, T. Dissimilar metal friction welding of austenitic–ferritic stainless steels. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 160, n. 2, p. 128–137, 2005.

SCHWARTZ, R.S.; EDELMAN, E.; VIRMANI, R.; CARTER, A.; GRANADA, J.F.; KALUZA, G. L.; CHRONOS, N. A.; ROBINSON, K. A.; WAKSMAN, R.; WEINBERGER, J.; WILSON, G. J. Drug-eluting stents in preclinical studies updated consensus recommendations for preclinical evaluation. **Circulation. Cardiovascular Interventions**, v. 1, n. 2, p.143-153, 2008.

SHAH, A.; SINHA, R.; HICKOK, N.; TUAN, R. High-resolution morphometric analysis of human osteoblastic cell adhesion on clinically relevant orthopedic alloys. **Bone**, v. 24, p. 499–506, 1999.

SEON, G.M.; SEO, H. J.; KWON, S.Y.; LEE, M. H.; KWON, B. J.; KIM, M. S.; KOO, M. A.; PARK, B. J.; PARK, J. C. Titanium surface modification by using microwave-induced argon plasma in various conditions to enhance osteoblast biocompatibility. **Biomaterials Research**, v. 19, n. 1, p.1-7, 2015

SOKOLOV, I.; DOKUKIN, M.E. AFM Indentation Analysis of Cells to Study Cell Mechanics and Pericellular Coat. In: **Nanoscale Imaging**. Humana Press: New York, p. 449-468. 2018

SOUSA, R.R.M.D.; ARAÚJO, F.O.D.; COSTA, J.A.P.D.; NISHIMOTO, A.; VIANA, B.C.; ALVES JR, C. Deposition of TiO₂ film on duplex stainless steel substrate using the cathodic cage plasma technique. **Materials Research**, v. 19, n. 5, p.1207-1212, 2016

SURI, C.; JONES, P.F.; PATAN, S.; BARTUNKOVA, S.; MAISONPIERRE, P.C.; DAVIS, S.; SATO, T.N.; YANCOPOULOS, G.D. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell**, v. 87, n. 7, p.1171-1180, 1996.

TRENGOVE, L. William Gregor (1761–1817) discoverer of titanium. **Annals of Science**, v. 29, n. 4, p.361-395, 1972

WANG, Y.; XU, C.; JIANG, N.; ZHENG, L.; ZENG, J.; QIU, C.; YANG, H.; XIE, S. Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy. **Scanning**, v. 38, n. 6, p.558-563, 2016.

WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.E.; MAREK, M.; GHAZI, M. Ability of Ni-containing biomedical alloys to activate monocytes and endothelial cells in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 45, p 251-257, 1999.

WU, B.; XIONG, S., GUO, Y.; CHEN, Y.; HUANG, P.; YANG, B. Tooth-colored bioactive titanium alloy prepared with anodic oxidation method for dental implant application. **Materials Letters**, v. 248, p.134-137, 2019

YAMAZAKI, K.; LEHR, J.E.; RHIM, J.S.; PIENTA, K. J. Establishment of an immortalized Copenhagen rat bone marrow endothelial cell line. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 10, n. 4, p.459-462, 1996.

YAZDANI, S.K.; NAKANO, M.; OTSUKA, F.; KOLODGIE, F.D; VIRMANI, R. Modelos animales de reparación vascular y reendotelización. **Revista Española de Cardiología Suplementos**, v. 13, p. 20-28, 2013.

ZHANG, L.; ZHAO, L.; OUYANG, P.K.; CHEN, P. Insight into the role of cholesterol in modulation of morphology and mechanical properties of CHO-K1 cells: An in situ AFM study. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 13, n. 1, p.98-107, 2019

ZHECHEVA, A.; SHA, W.; MALINOV, S.; LONG, A. Enhancing the microstructure and properties of titanium alloys through nitriding and other surface engineering methods. **Surface and Coatings Technology**, v. 200, n. 7, p.2192-2207, 2005.

ZIEBART, T.; SCHNELL, A.; WALTER, C.; KÄMMERER, P.W.; PABST, A.; LEHMANN, K.M.; ZIEBART, J.; KLEIN, M.O.; AL-NAWAS, B. Interactions between endothelial progenitor cells (EPC) and titanium implant surfaces. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 1, p. 301-309, 2013.