

## EFEITO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO NA ADESÃO PLAQUETÁRIA EM SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

<sup>1</sup>Gabriel de Moura Martins, <sup>2</sup>Jussier de Oliveira Vitoriano, <sup>3</sup>Alan Max Torquato de Souza, <sup>1</sup>Michelly Fernandes De Macedo, <sup>1</sup>Clodomiro Alves Junior, <sup>1</sup>Carlos Eduardo Bezerra de Moura

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Semi-árido, <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte,

<sup>3</sup>Universidade do Estado do Rio Grande do Norte

Biotecnologia e Inovação em Saúde

Comunicação Oral

[gabrielmouramartins@gmail.com](mailto:gabrielmouramartins@gmail.com)

### RESUMO

A formação de coágulos em implantes ósseos produz fatores pró-angiogênicos criando um microambiente adequado para que ocorra a osteogênese, garantindo o sucesso do implante ósseo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do plasma atmosférico frio (CAP) em superfícies de titânio (Ti) na adesão e ativação plaquetária e no tempo de coagulação. Para isso, foram produzidos discos de titânio tratados por CAP durante 15 minutos na voltagem de 15Kv, frequência de 600Hz e 1 L/min de hélio. A topografia foi avaliada por microscopia de força atômica (AFM), a composição química por espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS) e a molhabilidade por teste de gota sésil. Foram coletados 30mL de sangue com citrato de sódio 3,2%. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação a 1000 rpm por 5 min. O tempo de protrombina e tromboplastina parcial foram medidos usando um coagulômetro semiautomático. 800µL de PRP foram distribuídos sobre as amostras e incubados por 60 minutos a 37°C em atmosfera úmida. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS para remoção de plaquetas não aderidas, fixadas e observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e analisadas no software ImageJ. A adesão plaquetária foi determinada pela distância e número de plaquetas aderidas e ativadas. As amostras tratadas por CAP apresentaram maior ativação plaquetária, maior número de plaquetas na superfície e maior distância quando comparadas às polidas, o que resultou em menor tempo de coagulação proporcionando formação mais rápida de coágulos, frequentemente associado a maior biocompatibilidade do implante e melhor osseointegração.

**Palavras-chave:** Plasma de Pressão Atmosférica Não Térmica, implantes metálicos, hemocompatibilidade

## 1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais consistem em ligas metálicas, cerâmicas, polímeros que são usados com o objetivo de restaurar ou aprimorar tecidos perdidos ou lesionados, trazendo uma melhor qualidade de vida (Hudecki et al., 2018). O conhecimento das propriedades são fundamentais para direcionar a sua aplicação. Para tanto é necessário que esses materiais sejam hemocompatíveis, ou seja, apresentam interações adequadas com o sangue garantindo a homeostasia, sem prejuízo das funções (Cacopardo, 2022).

O titânio é o mais utilizado para aplicações biomédicas. Isso se deve por suas boas propriedades de biocompatibilidade, dureza e resistência à corrosão (Kulkarni et al., 2015). As superfícies de Ti podem ser melhoradas através de tratamentos de superfícies, onde o plasma atmosférico a frio (CAP) vem se destacando na última década devido possuir um baixo custo, utilizar baixas temperaturas e os gases utilizados são diversos, sendo os mais comuns o argônio e hélio devido apresentar maior estabilidade para geração do plasma e potencial de cicatrização (Bernhardt et al., 2019).

Durante o processo de implantação óssea, os biomateriais entram em contato com o sangue, levando a formação de coágulos sanguíneos em sua superfície antes da regeneração óssea, sendo um processo crucial para o sucesso do implante (Shiu et al., 2014). A formação de coágulos em implantes ósseos produz fatores pro-angiogênicos que garantem uma vasculatura concomitante à formação óssea, permitindo não apenas o fornecimento de oxigênio, fatores de crescimento e nutrientes para o local da lesão, bem como a migração de células-tronco mesenquimais (Nagata et al., 2010). Caso não ocorra a neovascularização, o implante é circundado por uma cápsula fibrosa, resultando em afrouxamento e, finalmente, falha (Raines et al., 2010). Desta forma, compreender a interação do implante com as células sanguíneas é de suma importância para melhorar a bio e hemocompatibilidade dos implantes e evitar os processos indesejáveis (Wang et al., 2014).

## 2 OBJETIVO

Avaliar o efeito do tratamento do plasma atmosférico a frio (CAP) aplicado a superfícies de implantes de titânio e sua ação na adesão plaquetária e formação de coágulos sanguíneos.

## 3 MÉTODO

Foram utilizados discos de titânio com as dimensões pré-definidas de 13 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Os parâmetros como molhabilidade, rugosidade e composição química foram caracterizados para as superfícies polidas e CAP. Desta forma, foram utilizados dois tipos de superfícies: polida e tratada por CAP. Os discos foram previamente lixados de maneira gradual, com lixas de carbetto de silício (SiC) com diferentes granulometrias, 220, 440, 600, 1500 e 2000 MESH e polidas em solução coloidal 40% Sílica ( $0,03 \mu$ ) e 60% de peróxido de hidrogênio à 30% durante 30 minutos. Após esse procedimento todas as amostras foram limpas onde os discos foram imersos em solução de 0,5% de detergente enzimático (DEIV) em água bidestilada em tratamento de ultrassom durante 10 minutos. Após duas lavagens, essas amostras foram lavadas em etanol absoluto, seguida da lavagem com água bidestilada e submetidos a ultrassom por 10 minutos. Quando todos os discos estavam lavados e secos uma parte dos discos foi destinada a realizar o tratamento a CAP durante 15 minutos com uma distância de  $20 \pm 1$  mm entre a amostra e o aparelho com tensão de 15Kv, frequência de 600Hz e utilizando hélio como gás de trabalho com fluxo de 1 L/min.

Após o preparo do material foi realizado a coleta e preparação do sangue. Este projeto está registrado comitê de ética e pesquisa da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN (Nº 3.637.781). O procedimento de coleta de sangue foi conduzido em conformidade com as instruções do manual de técnicas de coleta de sangue do ministério da saúde (2001). O volume coletado foi de 30 mL de um indivíduo humano maior de 18 anos por punção venosa com o anticoagulante citrato de sódio 3,2% na proporção de 9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante. Posteriormente, o sangue total foi fracionado para se obter o plasma pobre em plaquetas (PPP) a partir da centrifugação do sangue a 1000 rpm por 15 minutos.

Com o sangue preparado foi realizado a análise dos parâmetros hematológicos que foram obtidos antes e depois da exposição do sangue sobre as superfícies dos discos, utilizado um analisador hematológico automático MAXCEL VET (MEDMAX, Brasil), para avaliar alterações no eritrograma: nº de hemácias, leucócitos, linfócitos e neutrófilos. Para tanto, foi utilizado 1mL de sangue total aplicado sobre as superfícies dos discos de titânio tratados e não tratados por 30 min em incubadora a 37°C. Os dados foram comparados com o sangue sem exposição.

Para os ensaios de tempos de coagulação os discos foram distribuídos em quintuplicata nas placas de 24 poços e sobre a superfície distribuído o PPP de acordo com os tempos analisados, posteriormente foram incubados a 37°C por 30 min em atmosfera úmida. Após a incubação, as medidas do Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) foram

realizadas utilizando coagulômetro semi-automatizado Max CLOT (MEDMAX, Brasil), sendo para o TP adicionado 100  $\mu$ L do PPP e 200  $\mu$ L do reagente TP Líquida (LabTest diagnóstica, Brasil) composto por extrato de cérebro de coelho (fator tecidual) e cloreto de cálcio, e obtido o tempo e a atividade de protrombina. Já para o TTPa, serão adicionados 100  $\mu$ L do PPP, 100  $\mu$ L do reagente cefalina TTPa Líquida (LabTest diagnóstica, Brasil) e adicionado 100  $\mu$ L do cloreto de cálcio, e obtido o tempo de formação do coágulo.

Por fim, foi realizado a análise de adesão plaquetária através da exposição de 800  $\mu$ L do PRP sobre as superfícies durante 60min que foram avaliados através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) investigado a quantidade, morfologia e agregação das plaquetas aderentes através do software ImageJ.

As análises de caracterização das superfícies foram realizadas em triplicata, os testes hematológicos foram realizados em quintuplicata. Os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Então, submetidos a análise de variância ANOVA, seguida pelo teste Tukey-Kramer com significância  $p < 0.05$ .

#### **4 RESULTADOS**

As amostras tratadas por CAP apresentaram maior hidrofiliicidade ( $\Theta = 13^\circ \pm 3,2$ ) quando comparado as polidas ( $\Theta = 65^\circ \pm 3,5$ ). Na composição química da superfície CAP houve redução dos cátions Ti (IV) ao estado Ti (III) ejetando os átomos de oxigênio da superfície, ocorrendo a formação de vacâncias que aumentou a incorporação de hidroxilas na superfície. Na análise de AFM verificou-se que as amostras polidas possuíam uma superfície com picos irregulares e arredondados, enquanto nas tratadas havia maior regularidade na distribuição dos picos quando comparada com o polido.

Não houveram alterações significativas no número das células sanguíneas entre as amostras tratadas e não tratadas. Os tempos de TP para o controle (superfície da placa de cultura) e os discos de titânio não tratado e CAP foram de  $23.42 \pm 35,05$ ;  $100.02 \pm 0,044$  e  $10.98 \pm 45,90$  segundos, respectivamente. Os tempos de TTPa para o controle e os discos de titânio não tratado e CAP foram de  $97.66 \pm 50,23$ ;  $100.72 \pm 26,82$  e  $8.2 \pm 4,47$ , respectivamente. Além disso, as amostras tratadas por CAP apresentaram maior capacidade na ativação plaquetária ( $0.096 \pm 0.017$ ;  $p < 0,05$ ), maior densidade plaquetária ( $0.490 \pm 0.068$ ) e maior distância entre as plaquetas ( $3533.3 \pm 1958.71$ ) quando comparado as amostras somente polidas ( $0.089 \pm 0.016$ ), ( $0.435 \pm 0.076$ ), ( $3533.3 \pm 1958.71$ ), respectivamente.

## 6 DISCUSSÃO

A diminuição do tempo de coagulação nas amostras tratadas por CAP se deve as propriedades que a superfície adquiriu após o tratamento, especialmente a molhabilidade. A alta molhabilidade das superfícies tratadas por CAP permite que ocorra uma maior adsorção de proteínas, assim, aumentando a adesão e ativação plaquetária (Junkar, 2016). O aumento das plaquetas na interface implante/tecido produz fatores que ativam as duas vias da coagulação TP e TTPa, e assim, ocorra a formação dos coágulos (Rausch-fan et al., 2008). Os coágulos produzidos possuem fatores pro-angiogênicos que recrutam as células endoteliais para a formação de novos vasos sanguíneos aumentando a neovascularização, distribuição de nutrientes e fatores de crescimento necessários para que ocorra a osteogênese (Yin et al., 2021).

A formação dos coágulos promovido pelo tratamento de CAP nas superfícies demonstram um potencial na produção de implantes ósseos e dentários, cujo coágulo peri-implantar possui um papel importante para que ocorra a migração e diferenciação de células tronco mesenquimais que vão formar o novo tecido ósseo, garantindo o sucesso do implante (Baseri et al., 2020). Desta forma, a capacidade de coagulação das superfícies tratadas por CAP podem ativar vias para angiogênese, processo fundamental para osseointegração, podendo ser um novo caminho para futuros estudos e aplicações em implantes ósseos e dentários, somados ao fato de se tratar de uma técnica mais acessível e econômica (Tominami et al., 2017).

## 7 CONCLUSÃO

O tratamento de plasma atmosférico a frio quando aplicado ao titânio foi capaz de gerar superfícies com alta hidrofilicidade, que na interação com sangue não provocou alterações nos números de células sanguíneas. No entanto, induziu a formação mais rápida de coágulos. Essa capacidade é altamente desejável para superfícies de implantes osteointegráveis.

## REFERÊNCIAS

- Baseri, M., Radmand, F., Hamed, R., Yousefi, M., & Kafil, H. S. (2020). Immunological Aspects of Dental Implant Rejection. *BioMed Research International*, 2020.
- Bernhardt, T., Semmler, M. L., Schäfer, M., Bekeschus, S., Emmert, S., & Boeckmann, L. (2019). Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 10–13. <https://doi.org/10.1155/2019/3873928>

Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łos, M. J. (2018). Biomaterials, definition, overview. In *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine* (pp. 85–98). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1>

Junkar, I. (2016). Interaction of cells and platelets with biomaterial surfaces treated with gaseous plasma. In *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly* (Vol. 23, pp. 25–59). Elsevier

B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.abl.2016.01.002>

Kulkarni, M., Mazare, A., Gongadze, E., Perutkova, Kralj-Iglic, V., Milošev, I., Schmuki, P., Iglič, A., & Mozetič, M. (2015). Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology*, 26(6). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/6/062002>

Nagata, M. J. H., Messori, M., Pola, N., Campos, N., Vieira, R., Esper, L. A., Sbrana, M., Fucini, S., Garcia, V., & Bosco, A. (2010). Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 28(4), 468–473. <https://doi.org/10.1002/JOR.21027>

Raines, A. L., Olivares-Navarrete, R., Wieland, M., Cochran, D. L., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2010). Regulation of angiogenesis during osseointegration by titanium surface microstructure and energy. *Biomaterials*, 31(18), 4909–4917. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.071>

Ratner, B. D. (2013). Introduction: Biology and Medicine – Key Concepts in the Use of Biomaterials in Surgery and Medical Devices. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*, 393–394. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00035-8>

Rausch-fan, X., Qu, Z., Wieland, M., Matejka, M., & Schedle, A. (2008). Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (MG63) in response to titanium surfaces. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 24(1), 102–110. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2007.03.001>

Shiu, H. T., Goss, B., Lutton, C., Crawford, R., & Xiao, Y. (2014). Formation of blood clot on biomaterial implants influences bone healing. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 20(6), 697–712. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2013.0709>

Tominami, K., Kanetaka, H., Sasaki, S., Mokudai, T., Kaneko, T., & Niwano, Y. (2017). Cold atmospheric plasma enhances osteoblast differentiation. *PloS One*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0180507>

Yin, X., Yang, C., Wang, Z., Zhang, Y., Li, Y., Weng, J., & Feng, B. (2021). Alginate/chitosan modified immunomodulatory titanium implants for promoting osteogenesis in vitro and in vivo. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 124.

<https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2021.112087>