



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Roberto Vieira Resende

ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS
POR SUPERFÍCIES DE TITÂNIO E ZIRCÔNIA

Dissertação de Mestrado

Brasília, 2017



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Roberto Vieira Resende

ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS POR SUPERFÍCIES DE TITÂNIO E ZIRCÔNIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Fontes

Linha de Pesquisa: Imunologia / Proteômica de neutrófilos

Brasília, 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wagner fontes – UnB – Presidente

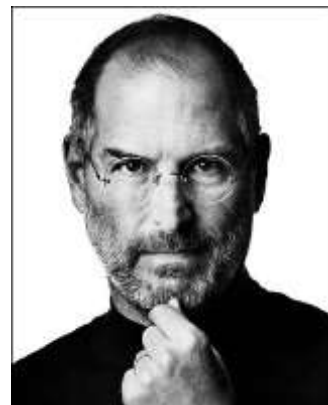
Dr. Everton Luis Santos da Roda – membro externo

Prof. Dr. Sébastien Charneau – UnB

Profª. Dra. Kelly Grace Magalhães – UnB - suplente

“Trocaria toda minha tecnologia por uma tarde com Sócrates.”

Steve Jobs



http://www.goodreads.com/photo/author/5255891.Steve_Jobs

DEDICATÓRIA



A minhas queridas avós:

Maura Rodrigues Kury, minha madrinha e avó paterna, e

Filocelina Vieira Ribeiro, minha avó materna,

pelo exemplo de trabalho, perseverança e visão do futuro.

Duas viúvas, duas costureiras, duas donas de pensão, que saíram do interior

pobre e sem perspectivas, indo tentar a sorte na capital do estado, onde

passaram por todo tipo de dificuldade e sofrimento, para que seus netos

pudessem acalentar o sonho de chegar a um mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos inicialmente ao dr. Vitório Campos, que fez vislumbrar a possibilidade de um mestrado na área de Patologia Molecular, e ao Alessandro da secretaria do PPGPM-MF-UnB, pela competência e cordialidade.

Muito especialmente, agradecemos aos colegas de laboratório. Sem os obstáculos criados, nosso nível de formação teria ficado abaixo daquele que conseguimos atingir.

Aos laboratórios de outras unidades que nos franquearam acesso a seus equipamentos de primeira linha, para complementação dos experimentos.

À Ingrid e ao Guilherme na utilização do MEV da Microscopia do Instituto de Ciências Bilógicas, ao Alexandre do MEV da Engenharia Mecânica.

Ao TPD Edimar, do Laboratório *Proceram*, pelo fornecimento da Zircônia pura e pela sinterização das amostras experimentais;

Ao colega Anderson da *Consit* Implantes pelo fornecimento das barras de Titânio, para que pudéssemos fabricar os discos das amostras.

À Caliandra, à Fabiana e ao Ângelo, por terem vindo de outros laboratórios pra tentar nos ajudar nos experimentos e resultados.

Muito especialmente a todos os doadores que emprestaram seus braços para que pudéssemos coletar de sangue para removemos os preciosos neutrófilos.

E, mais especialmente ainda, ao Prof. Wagner, pela orientação segura, tranquila, nos dando liberdade ação para o avanço de nossa aprendizagem.

Não poderíamos deixar de registrar nossa gratidão aos membros da Banca Examinadora, por sua disponibilidade, boa-vontade e empenho ao analisar nosso trabalho e contribuir para seu aprimoramento, e ao suporte e apoio financeiro das instituições UnB, CNPq e CAPES.

SUMÁRIO

Membros da Banca Examinadora	p. <i>i</i>
Epígrafe	p. <i>ii</i>
Dedicatória	p. <i>iii</i>
Agradecimentos	p. <i>iv</i>
Sumário	p. <i>v</i>
Lista de figuras	p. <i>vi</i>
Lista de tabelas	p. <i>viii</i>
Lista de pranchas	p. <i>ix</i>
Siglas e abreviações	p. <i>x</i>
Resumo	p. <i>xi</i>
Summary	p. <i>xii</i>
Introdução	p. 1
Neutrófilos	p. 4
Ativação de neutrófilos	p. 9
Fagocitose	p. 9
Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	p. 10
Redes de Armadilhas	p. 11
Apoptose	p. 13
Implantes	p. 13
Titânio (TiO ₂)	p. 19
Ligas de titânio	p. 23
Novas ligas de titânio	p. 24
Zircônia	p. 25
Titânio-Zircônia	p. 29
Justificativa	p. 32
Objetivos	p. 33
Material e métodos	p. 34
Resultados	p. 45
Discussão	p. 73
Conclusões	p. 75
Perspectivas	p. 75
Referências bibliográficas	p. 77
Apêndice	p. 84

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 - Células do sangue humano	p. 2
Fig. 2 - Tabela periódica	p. 15
Fig. 3 – Barras de zirconium	p. 20
Fig. 4 – Molécula de TiO ₂	p. 21
Fig. 5 - Implantes de dente e fêmur	p. 26
Fig. 6 – Sangue sobre Percoll	p. 36
Fig. 7 – Gradiente pós centrifugação	p. 36
Fig. 8 – Sangue separado no gradiente	p. 36
Fig. 9 – Teste dos discos em Eppendorf	p. 38
Fig. 10 – Resumo do desenho experimental	p. 38
Fig. 11 – Ativação de neutrófilos	p. 39
Fig. 12 – Células sobre disco Ti	p. 40
Fig. 13 – Células sobre disco Zr	p. 40
Fig. 14 – Secagem para microscopia eletrônica	p. 42
Fig. 15 – Metalização para microscopia eletrônica	p. 42
Fig. 16 – Suporte inclinado dentro do MEV	p. 43
Fig. 17 – Disco com neutrófilos no MEV	p. 43
Fig. 18 – Microscopia eletrônica de zircônia	p. 45
Fig. 19 – EDS de zircônia	p. 46
Fig. 20 – EDS de titânio	p. 46
Fig. 21 – Neutrófilos sobre titânio - MEV	p. 47
Fig. 22 – Neutrófilos sobre titânio – MEV - contagem	p. 47
Fig. 23 – Neutrófilos separados	p. 48
Fig. 24 – Neutrófilos separados e lavados	p. 48
Fig. 25 – Teste de pureza	p. 50
Fig. 26 – Teste de pureza	p. 50
Fig. 27 – Teste de viabilidade	p. 50
Fig. 28 – Teste de rendimento	p. 50
Fig. 29 – Gráfico de NBT-colorimétrico	p. 55
Fig. 30 – Gráfico de NBT-colorimétrico	p. 55
Fig. 31 – Gráfico de produção de EROs	p. 56

Fig. 32 – Neutrófilos ativados - MEV	p. 61
Fig. 33 – Lâmina sem neutrófilo - MEV	p. 62
Fig. 34 – Neutrófilo não ativado - MEV	p. 62
Fig. 35 – Neutrófilo sobre lâmina	p. 63
Fig. 36 – Neutrófilo sobre lâmina - MEV	p. 63
Fig. 37 – Superfície de neutrófilo	p. 64
Fig. 38 – Neutrófilo ativado - projeções	p. 65
Fig. 39 – Neutrófilo ativado	p. 65
Fig. 40 – Neutrófilo sobre zircônia - MEV	p. 66
Fig. 41 – Neutrófilo sobre zircônia - MEV	p. 66
Fig. 42 – Neutrófilo sobre zircônia - MEV	p. 67
Fig. 43 – Neutrófilo sobre titânio - MEV	p. 67
Fig. 44 – Neutrófilo ativado - MEV	p. 68
Fig. 45 – Neutrófilos com TNT - MEV	p. 69
Fig. 46 – <i>idem</i> - em maior aumento	p. 69
Fig. 47 – Neutrófilos sobre zircônia - MEV	p. 70
Fig. 48 – Neutrófilos sobre zircônia - MEV	p. 70
Fig. 49 – Neutrófilo alojado em zircônia	p. 71
Fig. 50 – Interação célula-superfície - MEV	p. 72
Fig. 51 – Interação célula-superfície - MEV	p. 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Subpopulações de neutrófilos	p. 8
Tabela 2 - Ligas de titânio	p. 24
Tabela 3 - Cristalografia da zircônia	p. 28
Tabela 4 - Preparação dos gradientes de Percoll	p. 35
Tabela 5 - Absorbância média	p. 56
Tabela 6 - Absorbância por superfície	p. 56
Tabela 7 - Absorbância por paciente	p. 57
Tabela 8 - Absorbância por superfície ANOVA	p. 57
Tabela 9 - Teste de Friedman ANOVA	p. 57
Tabela 10 - Diferenças entre condições	p. 58
Tabela 11 - Teste de Friedman – ANOVA	p. 58
Tabela 12 - Comparação de Dunn	p. 59

LISTA DE PRANCHAS

Prancha 1 - Teste NBT-lâmina	p. 51
Prancha 2 - Teste NBT-colorimétrico	p. 52-3
Prancha 3 - Gráficos de NBT-colorimétrico	p. 54
Prancha 4 - MEV de células sobre superfícies	p. 60

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- °C - Graus Celsius
- 3Y-TZP – Zircônia policristalina tetragonal estabilizada com ítrio
- ADN – ácido desoxi-ribo-nucleico
- ARN – ácido ribo-nucleico
- ASTM - Associação Norte-americana para Materiais e Testes
- ATZ – Zircônia reforçada por alumina
- CC – Creative Commons = Domínio público, uso livre para fim não comercial
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EDS / EDX – Análise elementar por difração de Raio X
- ENH / HNE - elastase neutrofílica humana
- ERO / ROS – espécies reativas de oxigênio
- VEs / EVs - Vesículas Extracelulares
- fMLNP – peptídeo *formyl Methyl Leucyl Phenilalanine* (fMLP)
- HBSS - Hank's Balanced Salt Solution / Solução salina de Hank
- LPS – lipo-poli-sacarídeo
- MEV – microscópio (ou microscopia) eletrônico(a) de varredura
- MO – microscópio (ou microscopia) óptico(a)
- MPT / PTM – modificação pós-traducional
- NBT – nitroazul de tuldina
- NETs - *Neutrophil Extracellular Traps*
- PMN – polimorfonucleado
- PCNA/ANPC - Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
- SIDA/AIDS – Síndrome da Imuno-Deficiência Aguda
- Ti – titânio
- Ti-Zr – liga de titânio-zircônio
- TiO₂ – óxido de titânio
- TNTs - Túneis de nano-túbulos
- Zr – zircônio
- ZrO₂ – óxido de zircônio=zircônia
- ZTA – Alumina reforçada por zircônia

RESUMO

Os glóbulos brancos neutrófilos são as primeiras células de defesa a chegar a qualquer local lesionado, seja lesão por processo biológico, seja por trauma acidental ou cirúrgico. No caso de implantes osteointegráveis, os neutrófilos interagem com a superfície dos implantes desencadeando uma série de sinalização.

O titânio é reconhecidamente o material de implante mais bem estudado com altos índices de sucesso. Recentemente, a zircônia está tendendo a substituir o titânio, em diversas partes do corpo humano, como material de implante.

Foram separados neutrófilos do sangue periférico de 8 doadores, jovens, sadios, do sexo masculino. Esses neutrófilos foram colocados sobre superfícies de titânio, zircônia comum, zircônia sinterizada e polietileno (controle), e incubados por 1 hora, para permitir a ativação. Depois, as amostras foram centrifugadas para testar a adesão dos neutrófilos e descartar aqueles fracamente aderidos. Tanto as amostras quanto o precipitado foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura, teste de produção de espécies reativas de oxigênio (NBT lâmina e colorimétrico).

Os exames de microscopia mostraram neutrófilos altamente ativados e aderidos às superfícies de titânio, zircônia e zircônia sinterizada. Quanto à produção de EROs, o titânio causou maior produção que a zircônia comum que, por sua vez causou maior produção que a zircônia sinterizada.

Pode-se concluir que superfícies de titânio, zircônia e zircônia sinterizada promovem ativação de neutrófilos, que se aderem fortemente a suas superfícies, e produzem espécies reativas de oxigênio. Há necessidades de mais pesquisas para desvendar os mecanismos e mediadores dessa adesão.

Palavras chave: Titânio, Zircônia, Neutrófilos, Implantes

SUMMARY

Neutrophil white blood cells are the first immune cells to reach any injured part of the human body, when wounded by biological causes, accidental or surgical trauma. In relation to osteointegrated implants, the neutrophils interact with the surface of the implants triggering a series of signaling.

Titanium is recognized as the best studied implant material with high success rates. Recently, zirconia was proposed as a substitute to titanium as implant material in different parts of the human body.

In our experimental design, neutrophils were separated from the blood of 8 healthy young, male donors. These neutrophils were placed on surfaces of titanium, common zirconia, sintered zirconia and polyethylene (control), and incubated for 1 hour to allow activation. The samples were then centrifuged to test for adhesion of neutrophils and to separate the weakly adhered cells. Both the samples and the precipitate were prepared for scanning electron microscopy, and reactive oxygen species production test (colorimetric and slide NBT).

Microscopy studies showed highly activated neutrophils adhering to the surfaces of titanium, zirconia and sintered zirconia. The tests for detection of ROS showed that titanium produced higher level than ordinary zirconia, which showed higher production than sintered zirconia.

Conclusions were that titanium, zirconia and sintered zirconia surfaces promote activation of neutrophils, which adhere strongly to their surfaces, and produce Reactive Oxygen Species. There is a need for deep researches to find out the mechanisms and mediators of these adhesion and signaling.

Keywords: Titanium, Zirconia, Neutrophil, Implants

INTRODUÇÃO

Há milênios, o ser humano tenta reparar a perda de dentes, com o objetivo de reconstruir seu aparelho estômato-gnático (RESENDE, 2002), restabelecendo o sorriso, a função mastigatória, a fonação, bem como o suporte dos tecidos moles.

Há décadas, o surgimento dos implantes osteointegráveis de titânio deu novo alento à reabilitação de pacientes com grandes perdas dentais. Desde então, biomateriais à base de titânio vêm sendo desenvolvidos para melhorar a qualidade de vida de muitos pacientes por todo o mundo (KIRMANIDOU, 2016). Implantes de titânio são amplamente usados nas áreas de Odontologia e Ortopedia em artroplastia (substituindo articulações), reconstrução espinal, maxilo-facial, e implantes dentários (KIRMANIDOU, 2016). O uso de implantes de titânio tem alto nível de sucesso e está muito bem documentado (ALTUNA, 2016) (OSMAN, 2015). Em odontologia, os implantes dentários têm uma longa história (OZKURT, 2011) (SAITO, 2014) (OSMAN, 2015), mas devido a potenciais comprometimentos estéticos e imunológicos com implantes de titânio, estão sendo desenvolvidas novas tecnologias como alternativas a esses implantes de metal (OZKURT, 2011) (SAITO, 2014). Estes novos materiais devem ter boa resistência à corrosão, biocompatibilidade e estar livres de elementos tóxicos (ELIAS, 2015-1). Biomateriais cerâmicos são hipoalergênicos e menos propensos a causar sensibilidade (SAITO, 2014). No entanto, essas novas tecnologias devem manter as características apresentadas pelos implantes de titânio (como biocompatibilidade, excelente osteointegração, boa adesão do tecido gengival) com suas altas taxas de sucesso (ALTUNA, 2016), acima de 95%. Apesar do reconhecido sucesso do titânio, novas ligas de Ti e tratamentos de superfície vêm sendo desenvolvidos, numa tentativa de superar algumas deficiências apresentadas pelos implantes de titânio (KIRMANIDOU, 2016), como, por exemplo, aumentar sua resistência, permitindo implantes mais finos, e maior facilidade na usinagem, no processo de fabricação no torno.

Há não muito tempo, foi introduzida a zircônia (óxido de zircônio, ZrO_2), que parece ser um material de implante adequado devido à sua cor semelhante ao dente (OZKURT, 2011) e à sua biocompatibilidade. Na ortopedia, titânio e zircônia têm sido utilizados para substituições na articulação do quadril, joelho e dedos.

Embora, hoje, hidroxiapatita e zircônia sejam usadas para implantes dentários, o titânio ainda é o material predominante (SAITO, 2014). Titânio puro ou liga de titânio são amplamente utilizados na cavidade oral, devido às suas qualidades excepcionais (ALTUNA, 2016), reconhecido como o padrão ouro para a substituição de dentes na odontologia de implantes (OZKURT, 2011).

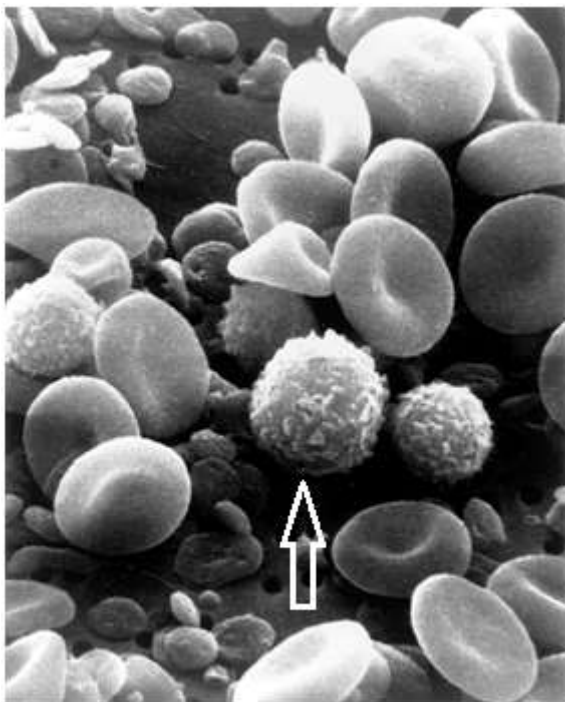


Fig. 1 - Células de sangue humano vistos por Microscopia eletrônica de Varredura (MEV). Por Bruce Wetzel (fotógrafo) e Harry Schaefer (fotógrafo) - National Cancer Institute (EUA), em Domínio público.

A seta mostra um neutrófilo.

Assim que os implantes são colocados no organismo, entram em contato com o sangue. Os glóbulos vermelhos, ou eritrócitos, são as células mais numerosas presentes no sangue humano (BRYK, 2017), variando de $4,5$ a $6,0 \times 10^6/\text{mm}^3$ no adulto. Se não considerarmos esses eritrócitos, os leucócitos são as células em maior número a circular em nosso sangue, variando entre $3,8$ e $9,8 \times 10^3/\text{mm}^3$ num adulto sadio.

Hemácias e plaquetas chegam logo à superfície dos implantes, mas não interagem com esses. Já os neutrófilos interagem fortemente (SILVA, VC, 2011) e, dependendo dessa interação, é que vai ser desencadeada uma série de sinalizações (DA ROSA, 2012)(KIRMANIDOU, 2016)(NAUSEEF, 2017) que vão resultar na osteointegração, ou na falha do implante.

Como o neutrófilo é o melhor modelo para reação orgânica, transdução de sinais, biologia celular e molecular (GABRILOVICH, 2005), antes de qualquer coisa, dever-se-ia estudar a reação desses neutrófilos aos biomateriais.

O fenômeno da osteointegração tem início com a adsorção de íon, proteínas, proteoglicanos, polissacarídeos pela camada de óxido de titânio. Finalmente, macrófagos, neutrófilos e células osteoprogenitoras migram para a interface osso-implante e fazem aposição de tecido mineralizado (KIRMANIDOU, 2016). Índices médios de contato osso-implante superiores a 60% correspondem a osteointegração de ótima qualidade (OSMAN, 2015).

Embora possa ser observado um contato direto entre osso e implantes, o que há, na maioria do contato, é uma zona de lâmina amorfa finíssima com 20-50 nm , que nunca excede a espessura de 400 nm . O processo de osteointegração leva de 3 a 5 meses para se completar adequadamente, e um fator desfavorável para implantes dentários e ortopédicos é a carga precoce (KIRMANIDOU, 2016), embora esteja em voga a colocação de implantes com carga imediata, e , em ortopedia, seja muito difícil se evitar a carga, pela impossibilidade de se imobilizar o pacientes pelo período de 3 a 5 meses.

Após colocado em função mastigatória, um implante tem sucesso, quando apresenta no máximo 1,5 mm de perda óssea marginal no primeiro ano e menos que 0,2 mm por ano subsequente (PESSOA, 2017).

Segundo Kirmanidou e equipe (2016), as características ideais de um implante deveriam ser (ou seja, até o momento, nenhum implante contempla todos estes requisitos):

❖ Para se evitar falhas mecânicas:

Alta resistência à corrosão, baixo módulo de elasticidade, alta resistência mecânica, e resistência ao desgaste;

❖ Para se evitar falhas biológicas:

Melhor biocompatibilidade, sem reação alérgica, sem citotoxicidade ou carcinogênese.

❖ Para se evitar falhas por infecção:

Propriedades antimicrobianas aumentadas.

1. Neutrófilos

Após a coloração de lâminas com esfregaço de sangue, a primeira fase da identificação em microscopia óptica da série branca (leucócitos), consistia em saber se a célula sanguínea tinha grânulos ou não. Daí veio o termo **granulócitos**. Passava-se, então, à identificação do tipo celular específico, dado pela reação à coloração: **neutrófilo**, basófilo e eosinófilo. Enquanto nos **agranulócitos** temos: linfócitos, macrófagos e monócitos, de acordo com Jeremy - Medic Guide (2008).

Em condições basais, o corpo humano produz 10^{11} neutrófilos por dia, o que torna esse neutrófilo polimorfonucleado a célula nucleada mais abundante na circulação humana. A vida média de um neutrófilo na circulação é de menos de 24 horas, quando, então, entra em apoptose (morte programada) (DANCEY, 1976)(SUMMERS, 2010)(LAHOZ-BENEYTEZ, 2016).

Sendo células muito importantes na resposta imunológica inata, os neutrófilos são de importância crítica para proteção contra infecções bacterianas e virais, e têm participação na resposta anti-tumoral (GABRILOVICH, 2005). Os neutrófilos têm um papel muito maior do que o imaginado, e interagem com outras células do sistema imunológico (SCAPINI, 2014)(NAUSEEF, 2014). Esses fagócitos amebiformes estão sempre vasculhando o ambiente à procura de pistas de invasores, aos quais respondem rapidamente seja por ingestão, morte ou degradação de potenciais patógenos (SCAPINI, 2014). Segundo Virella (2007), a ingestão e morte de microorganismos corresponde à sua principal função protetora.

Os neutrófilos derivam-se de células tronco hematopoiéticas, que – mediados pelo microambiente da medula óssea – se diferenciam em progenitores linfoides multipotentes e progenitores mieloides multipotentes. Desses últimos vêm as células granulócito-monócito progenitoras. Essas, por sua vez, dão origem tanto aos monoblastos quanto aos mieloblastos. Na granulopoiese, mieloblastos passam por maturação na medula e, após a maturação terminal, tornam-se neutrófilos polimorfonucleados e estão prontos para ir para a circulação sanguínea (CAWLAND, 2016).

Os leucócitos neutrófilos são ativos quanto à transcrição e produzem citocinas, condicionam macrófagos a uma resposta imunológica mais longa, contribuem ativamente na resolução da inflamação, e têm até memória (como outras células imunológicas) (NAUSEEF, 2016), são células dinâmicas e móveis que representam a

primeira linha de defesa contra muitos organismos infectantes (ENGLISH, D., 2005) (NAUSEEF, 2016). Ao desempenhar tal função, os neutrófilos executam muitas funções celulares que são conhecidas como resultado da ativação de vias de transdução de sinal. Como é uma célula madura e terminal, o neutrófilo não está sobrecarregado por maquinaria de replicação celular, fornecendo um modelo atraente para definir vias envolvidas na sinalização que levam à mobilização de Ca^{++} , dinâmica de actina do citoesqueleto, aderência e migração quimiotática, e liberação de moléculas de espécies reativas de oxigênio (ENGLISH, D., 2005), sendo considerado por Gabrilovich (2005) como um modelo único para o estudo de questões fundamentais da bioquímica celular e da biologia molecular, teste para novas hipóteses na transdução de sinais, na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), e mecanismos de adesão e mobilidade celular.

A descoberta de que praticamente todas as vias de sinalização dos neutrófilos convergem para coordenar, regular e orquestrar os efeitos celulares, resultou em uma nova interpretação de como as respostas celulares são integradas por processos bioquímicos que têm como consequência a otimização das respostas celulares (ENGLISH, D., 2005). Os resultados desses estudos têm amplas implicações para a nossa compreensão dos muitos processos biológicos. Uma compreensão emergente da ligação estreita entre imunidade inata e adaptativa coloca os neutrófilos em uma posição proeminente na iniciação e regulação de respostas imunológicas. Tornou-se cada vez mais claro que a manipulação terapêutica de neutrófilos poderia fornecer um método muito importante de tratamento de diferentes doenças (GABRILOVICH, 2005), devido à série de sinalização que desencadeiam e aos problemas que causam por, estando ativadas, permanecer nos tecidos ou retornar aos vasos sanguíneos capilares, e também como biomarcador funcional para os efeitos de ozônio nos pulmões (BOSSOM, 2013).

Os grânulos dos neutrófilos são formados quando os mieloblastos se diferenciam em promielócitos, estes são caracterizados por grânulos azurófilos e núcleos arredondados. O surgimento de grânulos específicos se dá quando os promielócitos se diferenciam em mielócitos. Nos metamielócitos o núcleo tem forma de rim, que depois se subdivide em grumos, característicos dos polimorfonucleados (Klausen, 2004)(Mora-Jensen, 2011). A proteína que define os grânulos azurófilos é a mieloperoxidase e outras proteases. Há outros grânulos com gelatinase mas, em humanos, não foram completamente identificados e classificados ou podem variar de acordo com a resposta imunológica requerida para cada caso (MOLLINEDO, 1984)(MOLLINEDO, 1991). A membrana dos grânulos se funde à membrana celular do neutrófilo quando da ativação,

o que é uma preparação para a degranulação ou exocitose (MILLER, 1984). Trapper et al. (2002) demonstraram que microtubos são importantes para direcionar grânulos azurófilos para os vacúolos fagocitários.

Na verdade, não está de todo claro que os primeiros pesquisadores estavam conscientes de que funções celulares definidas eram promovidas por eventos moleculares específicos (ENGLISH, 2005). Além da locomoção, os neutrófilos emitem e recebem moléculas de sinalização para comunicação com outras células a distância e, por outro lado, podem comunicar-se diretamente por citonemas. Os neutrófilos produzem também secreções bactericidas. As integrinas transmitem modificações conformacionais bidirecionalmente através da membrana. Por mais curioso que pareça hoje, isto se aplica a outros aspectos da biologia celular, bem como a outras áreas de pesquisa. Por exemplo, quando não conhecemos a base molecular de aspectos-chave da diferenciação e do desenvolvimento embrionários, talvez nem sequer consideremos que existam. A base molecular da diferenciação reversa não foi definida nem apreciada porque seu potencial não foi revelado até que Ian Wilmut clonou a ovelha *Dolly* (Dinnyes, 2002). As células-tronco não eram conhecidas como sendo um aspecto essencial do desenvolvimento até serem identificadas. Este paradoxo se aplica a todos os aspectos da pesquisa científica, e limita em profundidade o alcance de nossos estudos. Da mesma forma, quando um pesquisador começa a perceber que um processo previamente indefinido e não identificado deve realmente existir é muitas vezes o resultado de anos de pesquisa não recompensada, feita por pioneiros naquele campo, por homens e mulheres que levaram nossa compreensão da natureza de todos os seres vivos para os novos horizontes que agora vislumbramos. Na ciência, o pensamento implacável e o trabalho desses indivíduos forneceram a própria justificativa para nossa busca contínua de compreender a base da vida. Não está clara qual força poderosa que impele implacavelmente os seres humanos a refletir sobre sua própria existência, mas os problemas que os cientistas abordaram estão entre os mais complexos do universo. Resolvê-los, melhorou nossa qualidade de vida e nossa capacidade de tratar a doença (ENGLISH, 2005). Até poucas décadas, era impossível a substituição de um dente perdido. Hoje, isso é prática corriqueira.

Nos casos de qualquer perigo para o organismo, seja por infecção ou inflamação asséptica, os neutrófilos deixam os vasos sanguíneos atravessando o endotélio e, em alguns casos, o epitélio (nos casos de vias aéreas e trato gastro-intestinal) (NAUSEEF, 2016). Como os neutrófilos representam a primeira linha de defesa imunológica do

organismo, eles são rapidamente recrutados para as áreas onde o titânio ou a zircônia são implantados, interagindo com esses materiais (DA ROSA, E.L.S., 2012).

Quanto à base molecular da sinalização, há pouco mais de 30 anos, a identificação do AMP cíclico como ativador dependente do receptor de uma cascata enzimática intracelular levou a um novo conceito definidor, o conceito de um "segundo mensageiro". O próprio conceito de segundos mensageiros intracelulares, moléculas reguladas por agonistas extracelulares quando envolvem receptores celulares, mudaram radicalmente nossa perspectiva e ampliaram nossa abordagem para definir as bases moleculares da ativação celular. De fato, esse conceito forneceu a própria justificativa para esses estudos iniciais. Neste contexto, os estudos iniciais foram cuidadosamente concebidos para determinar como os receptores de membrana regulam os níveis de segundos mensageiros intracelulares e conduziram à identificação de proteínas heterotriméricas que mantêm a atividade da GTPase, agora designada por G-proteínas, como ligação entre o envolvimento do receptor e a ativação de alvo intracelular específico (RAMADASS, 2016).

Numa admirável orquestração de cruzamento de informações e sinalização entre os neutrófilos e células endoteliais, ambos modificam suas características celulares para permitir a migração transendotelial, sem comprometer a integridade vascular (NAUSEEF, 2016), na construção de um túnel, ainda não muito bem descrito. Uma vez nos tecidos, há uma migração em enxame, guiada por uma intrincada rede de troca de informações quimiotáxicas. Nessa troca de informações, o Leucotrieno B4 tem papel primordial (NAUSEEF, 2016).

Neutrófilos em contato com partículas e nanopartículas de TiO_2 são estimulados e podem ser observadas alterações na morfologia celular relacionadas à membrana e alterações do citoesqueleto com modificação das fibras de actina (DA ROSA, E.L.S., 2012), embora ainda seja pequeno o conhecimento sobre os mecanismos de adesão, espalhamento e ativação dos leucócitos em contato com diferentes superfícies de titânio (SILVA, V.C., 2011).

Tanto a ativação desses fagócitos em contato com micropartículas e consequente produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) e citocinas, quanto a dissolução passiva e translocação de partículas de TiO_2 já foram demonstrados. Entretanto, poucos relatos avaliam a interação dos neutrófilos humanos com nanopartículas de titânio (DA ROSA, E.L.S., 2012). E, quanto a neutrófilos sobre superfícies de Zircônia, esta dissertação parece ser um estudo pioneiro.

Os neutrófilos, na verdade, fazem muito mais coisas do que antes se supunha, inclusive interagindo com as demais células do sistema imunológico (NAUSEEF, 2016).

Já é conhecido o poder transcricional do neutrófilo e sua liberação de IL-8, produção de citocinas e quimiocinas (NAUSEEF, 2016). Existem neutrófilos associados a tumores (NATs) e subpopulações, ou polarização, de neutrófilos:

N1 = anti-tumorgênicos, pro-inflamatórios e

N2 = pro-tumorgênicos, imunossupressivos, anti-inflamatórios (Oliveira, 2016)(NAWAS, 2017). Também chamados fenótipos N1 e N2 (NAWAS, 2017). Essa polarização já havia sido descrita por Fridlender, Z.G. e colaboradores, em 2009.

O ácido hipocloroso dos neutrófilos tem ação também sobre células tumorais. Os neutrófilos podem acelerar o câncer e promover metástase. Já em outras circunstâncias, podem proteger o organismo da ação tumoral, causando citotoxicidade às células cancerosas (NAUSEEF, 2016), ou seja, modulam a resposta imunológica anti-tumoral (TREFFERS, 2016)(SINGEL, 2016).

As características encontram-se resumidas na Tabela 1:

TABELA 1 - Subpopulações de Neutrófilos	
N 1	N 2
pro-inflamatórios	anti-inflamatórios
anti-tumorais	pro-tumorais
não imunossupressivos	imunossupressivos
baixos níveis de TGF β ↓	altos níveis de TGF β ↑
CXCR4 ↓	CXCR4 ↑

Neutrófilos associados a tumores (N2) sofrem indução por altos níveis de TGF β (*transforming growth factor- β* = Fator β de crescimento e transformação), são caracterizados por alta expressão de Receptor 4 de Quimiocina CXC (CXCR4), fator de crescimento vascular endotelial – o que favorece o crescimento tumoral –, e matriz metaloproteinase 9. Já os neutrófilos não associados a tumores (N1) são induzidos pela inibição da sinalização do TGF β , expressam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, e podem matar células cancerosas. Devido à sua grande plasticidade, os neutrófilos podem também ser divididos por sua densidade, pelas características dos receptores de membrana, e expressão de proteínas de superfície são características para algumas

doenças ou condições, por exemplo, na sepse e doenças imunologicamente mediadas. Além disso tudo, os neutrófilos ainda dirigem a ativação de plaquetas e formação de trombos, angiogênese e remodelação tecidual, e podem se diferenciar em outros tipos celulares, como células dendríticas. Tudo indica que o micro ambiente possa tanto influenciar a diferenciação como controlar a especialização dos neutrófilos (OLIVEIRA, 2016)(TREFFERS, 2016)(SINGEL, 2016).

1.1 Ativação de Neutrófilos

A morfologia dos neutrófilos quiescentes exibe uma característica esférica e uma membrana com superfície irregular com várias microvilosidades (dobras ou projeções curtas), com comprimento médio de 300 nm. Durante a ativação dos neutrófilos, as dobras da superfície da membrana permitem a expansão e intensa mudança da morfologia dessas células (NAUSEEF, 2016).

O processo de ativação leva os neutrófilos inicialmente a uma deformação e, finalmente, à migração. O acúmulo de neutrófilos é regulado. Essa regulação inclui a rápida e eficiente eliminação das *L-selectinas* da superfície dos neutrófilos sob ativação por vários estímulos. Essa liberação se dá por um processo proteolítico (TODD, 1996 *apud* SILVA, V.C, 2011).

Os receptores expressos na membrana citoplasmática são os responsáveis por captar essas informações por levar a célula a promover (ou, em alguns casos, a inibir) a ativação (NAUSEEF, 2016).

1.2 Fagocitose

A fagocitose exige extensa modificação e remodelação da membrana celular do neutrófilo, feita por intrincadas mudanças bioquímicas e remodelação estrutural. (NAUSEEF, 2016)

A maior parte do efeito antimicrobiano do neutrófilo, no processo de fagocitose, é feita no fagossoma, um invólucro criado com membrana citoplasmática no processo de engolfamento. No fagossoma se dá a morte e a degradação dos restos do

agressor ou de debris teciduais que, de outra forma, continuariam a agir com estímulos à resposta imunológica (LEVIN, 2016).

Os grânulos são classicamente divididos em Mieloperoxidase positivos (ou Azurófilos) e Mieloperoxidase negativos (BAINTON, 1971), ambos contendo lisozima. Os grânulos azurófilos podem ser subdivididos em grânulos azurófilos ricos em defensina, e azurófilos pobre em defensina (RICE, 1986, 1987). Os peroxidase negativos podem ser divididos em 3 diferentes grupos – e mais subdivisões já foram propostas (KJELDSEN, 1993) .

Confinados no fagossoma, os componentes ingeridos sofrem ataques de NADPHoxidase e proteínas dos grânulos. Há fosforilações e mudanças conformacionais, e pela natureza eletrogênica da oxidase fagocítica, há um mecanismo para compensar a despolarização da membrana do fagossoma (EL BENNA, 2016).

1.3 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A ação dos neutrófilos se dá por geração de superóxidos aniônicos, peróxido de hidrogênio, produtos da cascata do fagócito NADPHoxidase, ácido nitroso (NAUSEEF, 2014), e até ozônio (BOSSOM, 2013).

Os neutrófilos convertem as informações do ambiente em sinalização para uma reação adequada, sendo que esses eventos metabólicos ocorrem não só na inflamação, mas também na composição do microambiente tumoral (NAUSEEF, 2016).

Os neutrófilos utilizam mieloperoxidase de proteína dos grânulos e peróxido de hidrogênio gerado pela NADPHoxidase para produzir o potente ácido hipocloroso (HOCl), que além de microbicida tem ação tóxica na resposta anti-tumoral (CLARK, 1981) (EL RAG, 1984). Essas habilidades tornam os neutrófilos preparados para assumirem a primeira linha de defesa do organismo (NAUSEEF, 2014).

Entretanto, a mieloperoxidase é apenas uma das proteínas dos grânulos a tomar parte na ação dos neutrófilos. Há também a elastase neutrofílica humana (ENH/HNE), PR3, catepsina G, e NSP4, que contribuem na ação antimicrobiana e na degradação tecidual (KETTRITZ, 2016).

1.4 Redes de Armadilhas, Comunicação e Vesículas

Em 2004, um grupo de cientistas liderados por Arturo Zychlinsky do Instituto Max-Planck descobriu que os neutrófilos podem formar redes extracelulares, usando uma estrutura formada por ácidos nucleicos e enzimas que capturam e matam bactérias (DA CUNHA, 2011).

Essas armadilhas extracelulares dos neutrófilos têm seu nome derivado do inglês – *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) (GUIMARÃES-COSTA et al, 2017)

Neutrófilos ativados liberam estruturas semelhantes a redes formadas por ácidos nucleicos bem como por cromatina modificada. NETose constitui uma importante estratégia da imunidade inata para matar patógenos extracelulares, utilizando também elastase neutrofílica. As fitas de cromatina são pegajosas e imobilizam os microorganismos, impedindo sua disseminação pelo organismo e na circulação sanguínea, quando o parasita se dissemina por essa via. Não obstante, a formação de NETs na circulação periférica pode causar microtrombose e até romper a barreira hemato-encefálica (BOELTZ, 2017) (GUIMARÃES-COSTA et al, 2017).

Já que os neutrófilos não utilizam o ADN para replicação, por ser uma célula madura e terminal (ENGLISH, 2005), eles utilizam essas longas tiras de ácidos nucleicos como armadilhas extra-celulares para a captura de bactérias e outros invasores. O núcleo do neutrófilo ativado perde seu envelope nuclear e a cromatina fica exposta ao material do citosol, ocorrendo a fusão da cromatina com o conteúdo tóxico dos grânulos, clivando as histonas e descondensando a cromatina, sendo essas fitas lançadas para fora do ambiente celular (FONSECA, 2017).

Embora a função principal das Armadilhas Extra Celulares de Neutrófilos seja capturar e matar microorganismos, estudos mostram que podem ter papel importante na resposta imunológica de doenças auto-imune, diminuindo a expressão do receptor de IL-4 nos macrófagos. Assim, esses não se diferenciam em células dendríticas, dificultando a resposta protetora contra parasitas (GUIMARÃES-COSTA et al, 2017).

Ainda, as NETs podem intensificar a resposta inflamatória em infecções virais de vias aéreas, piorando o quadro clínico. A conclusão é que a inibição de NETose pode ser um alvo terapêutico nos casos de asma viral (TOUSSAINT et al, 2017).

As células trocam informações, para se adaptar ao meio, se proteger de agressores e para controlar doenças. Isso pode ser feito por vesículas extracelulares (VEs) e por

túneis de nano-túbulos (TNTs = longas pontes entre células), unindo células a grande distância, e permitindo troca de material citoplasmático. Há um sinergismo entre nanotúbulos e vesículas extracelulares, num processo denominado heteroplasmia. Na verdade, são conduítes em nano-escala, permitindo o contato direto entre células (NAWAS, 2017).

A troca de informações entre células é primordial para diferenciação celular, desenvolvimento e manutenção da homeostasia tecidual. Não havendo contato direto, as células podem secretar citocinas, quimiocinas e fator de crescimento.

As células secretam diferentes tipos de nanovesículas. Criou-se até a Sociedade Internacional para Vesículas Extracelulares, que classificou as Vesículas Extracelulares (VEs) em exossomas (40 - 120 nm); ectossomas (100 - 1.000 nm), e encossomas (1 - 10 μm).

Desintegração apoptótica indiscriminada produz corpos apoptóticos que também são considerados Vesículas Extracelulares (VEs). VEs possuem uma camada lipídica dupla com esfingolipídeos, colesterol e componentes de ceramida. Têm superfície esférica ou em forma de xícara, quando vistas sob MEV, e podem secretar no meio extra-celular. São bem caracterizadas pela presença de integrinas e tetraespacinas em suas superfícies, com CD9, CD63, CD81, proteínas citoplasmáticas de choque térmico HSP70, e outras proteínas como GAPDH, Tsg101 e Alix. São marcadores para detecção, porém o conteúdo biomolecular pode variar enormemente.

TNTs são extensões citoplasmáticas transitórias de base actínica esticadas entre células como condutos nanotubulares, medindo de 50 a 200 nm (descritos pelo Dr. Rustom e colegas em 2004). Sua biossíntese é atribuída à polimerização da f-actina. São de secreção parácrina, mas condutos diretos intercelulares de comunicação rápida (NAWAZ, 2017).

Assim como as Vesículas, TNTs também apresentam subtipos e estruturas morfológicamente heterogêneas, e podem usar proteínas motoras. Cada vez mais as VEs vêm ganhando destaque na comunicação intercelular e no transporte de carga bioativa. A comunicação via TNT é menos conhecida. O transporte de ambos é bidirecional. Subtipos de TNT mais grossos chegam ao diâmetro de quase 1 micrômetro, onde podem transitar mitocôndrias inteiras (NAWAZ, 2017). VEs transportam moléculas bioativas como: lipídios, proteínas, ácidos nucleicos tanto genético quanto ADN mitocondrial, mARNs, miARNs, e outros mcARNs, podendo as mais largas transportar vesículas lisossomais (NAWAS, 2017).

1.5 Apoptose

A vida média de um neutrófilo na circulação é de 24 horas, quando entra em apoptose (DANCEY, 1976)(SUMMERS, 2010)(LAHOZ-BENEYTEZ, 2016), após seu trabalho de patrulhamento.

O estudo da sinalização reguladora das vias de morte dos neutrófilos é um campo de rápido progresso, com ênfase no Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), proteína que parece regular a sobrevivência do neutrófilo (NAUSEEF, 2016).

O PCNA não parece fazer parte da maquinaria nuclear da célula, mas sim de um complexo proteico que redireciona a programação de apoptose do neutrófilo, fazendo com que esse sobreviva por mais tempo, por mecanismos ainda não esclarecidos (NAUSEEF, 2016).

Após a batalha e ataques contra seus alvos, o neutrófilo entra em apoptose e precisa ser removido sem causar respostas imunológicas, o que evita o prolongamento da inflamação e restaura a homeostase. Ao final, macrófagos fagocitam os neutrófilos apoptóticos, pelo processo chamado de eferocitose (deCATHELINEU, 2003)(GARDAI, 2005), do latim “*effere*” significando túmulo, sepultura.

Porém, a eferocitose nem sempre é efetiva, o que leva os corpos apoptóticos a entrarem em necrose, espalhando seus conteúdos citoplasmáticos, e aumentando a inflamação no meio (SCHAEFER, 2014), e, daí advém inúmeros problemas causados pela ação inicial dos neutrófilos.

2. Implantes

Desde os anos 60, os implantes de titânio introduzidos pelo Dr. Brånemark tornaram-se uma opção de tratamento confiável para a substituição de dentes perdidos.

As propriedades físicas e químicas de superfície, composição e conformação externa são bem definidas e permitem traçar um prognóstico na terapia com implantes. (OSMAN, 2015)

O material de implante ideal deve ser biocompatível, de resistência adequada a deformação, corrosão, fratura e desgaste, e o modelo e fabricação do implante deve estar de acordo com suas propriedades físicas (PARR, 1985)(SMITH, 1993).

Os materiais de implantes são classificados de acordo com sua composição química e reação biológica que causam ao ser implantados (OSMAN, 2015).

Quanto à composição química, os implantes dentários podem ser classificados em metais, cerâmicas ou polímeros (OSMAN, 2015):

❖ **Metais**

Variam desde o titânio comercialmente puro, passando por suas ligas de Titânio-Alumínio-Vanádio (Ti-6AL-2V), Titânio-Vanádio-Nióbio (Ti-6Al-7Nb), algumas até com Ferro (OSMAN, 2015) e, mais recentemente, ligas de Titânio-Zircônio (85%Ti-15%Zr) (OSMAN, 2015) (BADRAN, 2017). Ainda, Aço inoxidável, Cromo-Cobalto (*Vitallium*), Ligas de Ouro, e Tântalo (OSMAN, 2015).

❖ **Cerâmicas**

Alúmina, Hidroxiapatita, Tricálcio-fosfato, Carbono, Carbono-Silício, Zircônia (ZrO₂), Alúmina reforçada com Zircônia (ZTA) (OSMAN, 2015).

❖ **Polímeros**

Polimetilmetacrilato (PMMA), Politetrafluoretileno (PTFE), e outros (OSMAN, 2015).

Osman e colaboradores (2015), comparando os implantes de titânio com os de zircônia – notar a proximidade dos dois na Tabela Periódica (fig. 2), numa extensa revisão sobre osteointegração, relatam que, em experimentos com animais, em diferentes modelos animais e diferentes condições de cargas, os autores encontraram índices médios de contato osso-implante superiores a 60%, o que corresponde a osteointegração de ótima qualidade. Estudos em cães mostraram aposição óssea direta sobre implantes de zircônia, com contato osso-implante de 81,9% nos implantes sem carga, e 69,8% nos implantes com carga.

Vários autores concluem que a osteointegração na zircônia é comparável ou até melhor que a do titânio (SCHULTZE-MOSGAU, 2000)(GAHLET, 2012).

Tabela periódica

3	—	número atômico
Li	—	símbolo químico
(6,941 - 6,941)	—	nome
	—	peso atômico

(os valores de massa de isotopo são arred.)

1	2											13	14	15	16	17	18	
1 H hidrogênio 1,008																	2 He hélio 4,0026	
3 Li lítio 6,94	4 Be berílio 9,0122											5 B boro 10,81	6 C carbono 12,011	7 N nitrogênio 14,007	8 O oxigênio 15,999	9 F flúor 18,998	10 Ne neônio 20,180	
11 Na sódio 22,989	12 Mg magnésio 24,304											13 Al alumínio 26,982	14 Si silício 28,086	15 P fósforo 30,974	16 S enxofre 32,06	17 Cl cloro 35,45	18 Ar argônio 39,948	
19 K potássio 39,098	20 Ca cálcio 40,078(4)	21 Sc escândio 44,956	22 Ti titânio 47,867	23 V vanádio 50,942	24 Cr cromo 51,996	25 Mn manganês 54,938	26 Fe ferro 55,845(2)	27 Co cobalto 58,933	28 Ni níquel 58,693	29 Cu cobre 63,546(3)	30 Zn zinco 65,38(2)	31 Ga gálio 69,723	32 Ge germânio 72,630(8)	33 As arsênio 74,922	34 Se selênio 78,971(8)	35 Br bromo 79,904	36 Kr criptônio 83,798(2)	
37 Rb rubídio 85,468	38 Sr estrôncio 87,62	39 Y itríio 88,906	40 Zr zircônio 91,224(2)	41 Nb nióbio 92,906	42 Mo molibdênio 95,94	43 Tc tecnécio [98]	44 Ru rútenio 101,07(2)	45 Rh ródio 102,91	46 Pd paládio 106,42	47 Ag prata 107,87	48 Cd cádmio 112,41	49 In índio 114,82	50 Sn estanho 118,71	51 Sb antimônio 121,76	52 Te telúrio 127,60(3)	53 I iodo 126,90	54 Xe xenônio 131,29	
55 Cs césio 132,91	56 Ba bário 137,33	57 a 71	72 Hf hafnio 178,49(3)	73 Ta tântalo 180,95	74 W tungstênio 183,84	75 Re rênio 186,21	76 Os ósio 190,23(3)	77 Ir írio 192,22	78 Pt platina 195,08	79 Au ouro 196,97	80 Hg mercúrio 200,59	81 Tl talco 204,38	82 Pb chumbo 207,2	83 Bi bismuto 208,98	84 Po polônio [209]	85 At astato [210]	86 Rn radônio [222]	
87 Fr frâncio [223]	88 Ra rádio [226]	88 a 102	103 Rf rutherfordio [261]	104 Db dubnio [262]	105 Sg seabórgio [263]	106 Bh bohrio [264]	107 Hs hásio [265]	108 Mt meitnério [266]	109 Ds darmstadtio [267]	110 Cn copernício [268]	111 Rg roentgênio [269]	112 Cn copernício [269]	113 Nh nihônio [270]	114 Fl flúvoro [270]	115 Mc moscovio [270]	116 Lv livermório [270]	117 Ts tenessino [270]	118 Og oganessônio [270]
57 La lantanio 138,91	58 Ce cério 140,12	59 Pr praseodímio 140,91	60 Nd neodímio 144,24	61 Pm promécio [145]	62 Sm samário 150,36(2)	63 Eu europio 151,96	64 Gd gadolínio 157,25(3)	65 Tb terbio 158,93	66 Dy dissprósio 162,50	67 Ho hólio 164,93	68 Er érbio 167,26	69 Tm tulio 168,93	70 Yb itérbio 173,05	71 Lu lutécio 174,97				
89 Ac actínio [227]	90 Th tório 232,04	91 Pa protactínio 231,04	92 U urânio 238,03	93 Np neptúcio [237]	94 Pu plutúcio [244]	95 Am amélio [243]	96 Cm cúrio [247]	97 Bk berquélio [247]	98 Cf califórnio [251]	99 Es eesbório [252]	100 Fm fermório [257]	101 Md mendelécio [258]	102 No nobélio [259]	103 Lr lawrencio [260]				

www.tabelaperiodica.org
Licença de uso Creative Commons BY-NC-SA 4.0 - Use somente para fins educacionais
Caso encontre algum erro favor avisar pelo e-mail tabelaperiodica@gmail.com
Versão IUPAC (pt-br) com 3 algarismos significativos, baseada em IUPAC 1515 (2015-03-01 - atualizada em 27 de março de 2017)

Fig. 2 - Tabela Periódica mostrando que os elementos Titânio e Zircônio estão no mesmo Grupo (coluna IV) dentre os Semi-metais. (Em *Creative Commons*=Domínio Público na internet).

A microtopografia de superfície foi estudada em diferentes experimentos, tanto com zircônia quanto com titânio, e, embora o contato osso-implante tenha sido o mesmo, maior torque foi necessário para remover implantes com tratamento de superfície (OSMAN, 2015).

Já outro grupo de estudo reporta que a cobertura com Biovidro acelera o reparo ósseo e a osteointegração, bem como vários outros estudos concordam que as modificações de superfície aumentam a adesão de osteoblastos e a melhora da regeneração óssea. Os implantes de zircônia, quando recebiam jato de areia, mostraram-se com maior e melhor estabilidade do que os sem tratamento de superfície (OSMAN, 2015).

Outros autores testaram superfícies modificadas dos implantes de zircônia com implantes de titânio com superfícies jateadas e com tratamento ácido, e os implantes de titânio precisaram de mais torque para serem removidos, embora o grau de contato osso-implante e volume aposição óssea tenham sido semelhantes em todos os implantes. (OSMAN, 2015).

A despeito de todos esses estudos, uma revisão mais recente não conseguiu estabelecer diferenças estatisticamente significativas entre as forças de torque para

remoção e contato osso-implante dos implantes de zircônia quando comparados com aqueles de titânio, em estudos feitos em animais (OSMAN, 2015).

Um grupo de pesquisadores fez cultura de células e encontrou que células semelhantes a osteoblastos se depositaram igualmente sobre superfícies de titânio ou de zircônia. Já outros estudos descrevem superfícies tratadas de zircônia apresentando uma maior adesão, proliferação e diferenciação dos osteoblastos (OSMAN, 2015).

Foi feito também um estudo com superfícies tratadas a *laser*, e os resultados mostraram maior molhabilidade nas superfícies tratadas. Os autores daquele estudo atribuem melhores resultados devidos à maior energia de superfície conferida pelo tratamento com *laser* (HAO, 2005).

Testes também foram feitos com luz Ultra-Violeta, e os resultados mostraram profundas modificações nas propriedades físico-químicas das superfícies. Houve diminuição de carbono, e a superfície ficou mais hidrofílica, porém mais testes são necessários para se avaliar o feito sobre as células. (OSMAN, 2015).

Pesquisadores reportam um excelente estado periodontal ao redor de conectores e implantes feitos de zircônia. Tanto teste *in vitro* como *in vivo* mostraram um menor infiltrado inflamatório nos corpos de prova de zircônia, com melhor regeneração e menor adesão de placa microbiana (OSMAN, 2015). Também quanto à adesão, discos de zircônia mostraram menor adesão de bactérias, quando comparados a discos de titânio, tendo o mesmo resultado favorável à zircônia se repetido em testes de parafusos de cicatrização de zircônia e titânio, numa avaliação das condições dos tecidos moles ao redor (OSMAN, 2015).

Porém, vários outros experimentos com animais (incluindo até macacos) não mostraram diferenças estatisticamente significantes do estado dos tecidos gengivais circunvizinhos em comparações entre intermediários de zircônia e de titânio, embora mostrassem diferença com o grupo controle de ouro-platinado (Au-Pt). Também a qualidade do tecido ao redor de implantes de titânio e zircônia não tinha diferença. Experimentos também foram conduzidos sobre o efeito sobre a gengiva, crescimento de fibroblastos e inserção epitelial sobre superfícies de titânio e de zircônia, não tendo sido encontradas diferenças significativas (WELANDER, 2008)(KOHAL, 2004).

Relatos de casos clínicos demonstram o uso de implantes de zircônia em peça única na substituição de dentes uni e multi-radiculados nos dois maxilares com excelente resultado estético e funcional, no período de 1 a 3 anos de observação. Esses

resultados se assemelham a pesquisas com implantes de titânio observados por 24 meses em função clínica (OSMAN, 2015).

Pesquisas multicêntricas com utilização de implantes imediatos de zircônia com carga imediata não conseguiram chegar a uma conclusão, porém os autores citam que implantes de zircônia feitos imediatamente após a extração apresentam maiores falhas que os de titânio feitos em osso cicatrizado (CANNIZARRO, 2010).

Dois estudos clínicos prospectivos mais recentes reportam o uso de implantes de zircônia em duas peças em maxilares de pacientes parcialmente edêntuos. As conclusões mostram uma possível indicação dos implantes de zircônia, com ênfase em mais longos estudos sobre o tema para confirmar os dados encontrados (CIONCA, 2014)(PAYER, 2014).

As revisões tentam elucidar se os materiais usados, o desenho exterior, a micro estrutura e composição química e dimensões dos implantes podem servir como parâmetros para a predição de sucesso (OSMAN, 2015), de osteointegração de qualidade, de periodonto sem inflamação, sem perda óssea e com inserção epitelial adequada.

Os implantes de titânio, normalmente, não obtêm bons resultados na reabsorção periimplantar, quando submetidos a ciclos de alta carga. O mesmo ocorre com cargas não axiais, havendo fadiga do metal e mesmo fratura (OSMAN, 2015).

Com a introdução dos implantes de titânio-zircônia de menor diâmetro, o leque de indicação de implantes também aumentou. Assim, tratamento com implantes pode ser oferecido a pacientes com situação de pouca disponibilidade óssea, bem como a pacientes que não aceitem ou não possam se submeter a grandes cirurgias de enxerto ósseo antes de receber os implantes (OSMAN, 2015).

Entretanto, problemas de sobrecarga pelo diâmetro reduzido dos implantes não podem ser desprezados, e deve haver um julgamento clínico muito apurado, antes da indicação, especialmente em áreas posteriores (OSMAN, 2015).

A tendência de aumentar as indicações de implantes de zircônia para satisfazer à demanda estética dos pacientes é cada vez maior, deve ser vista com prudência e cautela, uma vez que a zircônia não deixou de ser uma cerâmica friável susceptível a defeitos de superfície que podem influenciar negativamente seu comportamento (OSMAN, 2013)(ZHANG, 2013)(OSMAN, 2014).

Assim, um controle de qualidade requintado durante a fabricação deve ser exigido a fim de se assegurar um bom desempenho clínico (OSMAN, 2013).

Todas as áreas que possam funcionar como concentradoras de estresse devem ser evitadas ou minimizadas nos desenhos dos implantes de zircônia. Também as espiras de roscas internas com ângulos vivos na junção da rosca com o corpo do implante devem ser reduzidas, e também a profundidade das espiras deve ser lavada em consideração. Roscas profundas podem interferir com o osso durante a colocação do implante, especialmente nos casos de osso com alta densidade (OSMAN, 2015). Isso pode se traduzir em maior força para rosquear o implante, o que pode resultar em forças laterais que comprometam o sucesso futuro, inclusive com fraturas (OSMAN, 2013).

Assim, as pesquisas futuras deverão concentrar sua atenção na profundidade ideal das espiras, no planejamento da nova geração de implantes. Como as forças oclusais que induzam à flexão aumentam com a perda óssea, qualquer perda óssea de progressão rápida deve ser avaliada quanto à carga e complicações mecânicas futuras, até mesmo fraturas (MORGAN, 1993)(VIRDEE, 2007).

O uso de implantes de zircônia com diâmetros menores do que 3,25 mm deve ser evitado (GAHLET, 2012). O mesmo que acontece (ou acontecia) com o titânio, uma vez que não se recomendava a fabricação de implantes com diâmetro inferior a 3,3 mm.

Modificações no protocolo cirúrgico devem ser introduzidas, quando se tratar de implantes de zircônia em osso denso. Talvez, um ligeiro preparo a mais possa ser indicado, para ser evitar o torque feito manualmente, que induz forças de flexão indesejáveis (OSMAN, 2015). Possivelmente, voltemos a usar implantes cilíndricos de alta qualidade como os modelos do IMZ e Calcitec da década de '80.

Do ponto de vista histológico, a zircônia pode ser indicada como material para a fabricação de implantes dentais, pois vários estudos em animais demonstraram um maior crescimento ósseo sobre a zircônia ou no mínimo igual àquele sobre o titânio. Porém do ponto de vista clínico, ainda não há dados científicos válidos e confiáveis o suficiente para se indicar implantes de zircônia em seres humanos, uma vez que a literatura traz casos clínicos isolados, ou estudos com avaliações por curtos períodos de tempo e com poucos participantes (OSMAN, 2015).

Uma prototipagem rápida por adição com novas tecnologias de engenharia (impressora 3D) devem ser exploradas para a nova geração de implantes, tanto de zircônia, quanto de titânio (ABDUO, 2014)(WÄTJEN, 2014). Essas novas tecnologias desperdiçam muito menos material que a fresagem convencional, e o material que sobra pode ser reutilizado em processos futuros. Diferentes objetos podem ser impressos ao

mesmo tempo. No caso da zircônia, a dureza do material não é tão crítica como no caso da fabricação por fresagem (ABDUO, 2014).

Zircônia sinterizada é muito dura e requer troca constante das fresas durante a fabricação do implante, o que pode levar a imperfeição de pequenos detalhes, o que também pode ser causado por defeito do instrumental. Pequenos detalhes são difíceis de ser feitos, o material é passível de lascas, trincar e sofrer deterioração superficial (OSMAN, 2015).

Resumindo, a prototipagem rápida por impressão 3D é uma nova tecnologia que pode prover implantes individualizados para cada caso em particular, com o material de escolha mais adequando ao caso, e isso representa um vasto campo a ser explorado em um futuro próximo (OSMAN, 2015). E essa tecnologia já está disponível em Brasília.

2.1 Titânio (TiO₂)

Os bons resultados tornaram o titânio o “padrão ouro” para implantes dentários, enquanto resultados não muito positivos tornaram ultrapassadas ligas de ouro, aço e cromo-cobalto (OSMAN, 2015).

Existem uma Associação Norte-americana para Materiais e Testes (ASTM) (similar ao Inmetro brasileiro). Segundo ela, há 6 tipos de titânio para implantes: 2 ligas de titânio e 4 graus de titânio puro, que contêm algum traço de Carbono, Nitrogênio, Oxigênio e Ferro (McCRACKEN, 1999).

Quanto mais baixo o grau, maior a pureza do titânio. Porém, quanto mais alto o grau, mais fácil de se trabalhar com ele (OSMAN, 2015). A dúvida fica quanto às qualidades biológicas na presença desses traços metálicos.

Foi o mineralogista amador William Gregori quem descobriu o titânio, em 1791. Porém, foi o químico alemão Martin Heinrich Klaproth quem deu o nome de titânio, em referência aos Titãs da mitologia grega (Deuses filhos da Mãe Terra e do Pai Céu que desafiaram Zeus). O titânio puro é abundante na crosta terrestre, mas só pôde ser isolado a partir da invenção de Kroll, em 1946 (figs. 3 e 4). Modernamente, devido a suas excelentes qualidades físicas e mecânicas, o titânio é muito empregado em ortopedia e

odontologia, por seu alto módulo de elasticidade à tensão, e resistência à corrosão (KIRMANIDOU, 2016).

O Titânio é biocompatível e insolúvel e vem sendo amplamente utilizado na área da saúde como implantes (de raízes dentárias, telas e tubos), por ter sido por longos anos considerado inerte. Os nanomateriais, como o TiO_2 podem ser concebidos em diferentes formas e tamanhos, com respostas variadas, dependendo das propriedades de sua superfície. Os neutrófilos reagem fortemente ao titânio, sendo ativados, modificando sua morfologia e fisiologia, produzindo espécies reativas de oxigênio (SILVA, 2011) (DA ROSA, 2012).



Fig. 3 - Cubo de 1 cm^3 do metal Zirconium de alta pureza (99,95%) e barras de Zirconium puro (99,97%) com diferentes texturas de superfície obtidas por distintos processos de cristalização. (disponível na internet com atribuição CC – *Creative Commons* – licença para distribuir em qualquer suporte e adaptar/transfromar)

O que dá excelentes qualidades ao titânio, é a camada de óxido que o reveste, TiO_2 , formado por uma reação espontânea do titânio em contato com o ar. Essa película de óxido de 4nm de espessura parece ser a responsável pela inércia e estabilidade química do metal, por sua resistência à corrosão e até por sua biocompatibilidade. (KIRMANIDOU, 2016)

Próteses de ombro, quadril e joelho têm taxa de sucesso de 53 a 98,7%, enquanto os implantes dentários, de 90 a 96,5% (KIRMANIDOU, 2016).

Embora os resultados sejam muito bons, há cirurgias de “revisão”, o que denota necessidade de aprimoramento (KIRMANIDOU, 2016).

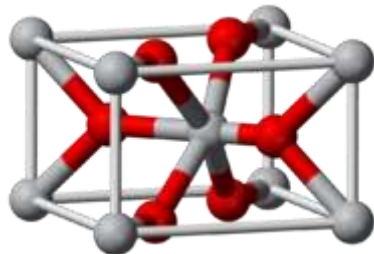


Fig. 4 – Molécula de dióxido de titânio, responsável pela interação implante-corpo humano (disponível na internet com atribuição *Creative Commons*)

As complicações vêm com 7 anos após a implantação, e são mais relacionadas à qualidade do osso e eventos de infecções do que ao diâmetro do implante (BALDRAN, 2017). As causas de falha são infecção, fratura do implante, fadiga do material, desgaste das articulações e inflamação (séptica ou não) (KURTZ, 2013).

Interações eletroquímicas e corrosão pode ocorrer por contato do implante com líquido extra celular, já que o corpo humano contém complexos orgânicos, proteínas, aminoácidos, saliva, linfa, cálcio, magnésio, potássio, o que o torna um ambiente hostil aos implantes (HANSEN, 2008).

As fraturas de implantes dentários variam de 0,2 a 1,5% , em estudos longitudinais por 15 anos (KIRMANIDOU, 2016).

A corrosão pode levar partículas do material de implantes para os tecidos peri-implantares e para outros órgãos (KIRMANIDOU, 2016). A presença de flúor e placa bacteriana, especialmente na boca, pioram esses fenômenos (KIRMANIDOU, 2016).

Ainda, com relação à liga Ti-6AL-4V, as partículas de alumínio são consideradas tóxicas, e as de vanádio, mutagênicas, tendo sido associadas a distúrbios neurológicos, osteomalácia e mal de Alzheimer (CATALANI, 2013).

Pessoa e colaboradores (2017) realizaram análise estrutural pelo método de elementos finitos, para determinar as cargas incidentes sobre os implantes e seus efeitos na estrutura óssea circunjacente, bem como nos elementos de fixação das próteses sobre implantes. Havia a hipótese que o tipo de conexão entre o implante (raiz artificial) e a coroa dental sobre o implante poderia ter influência no tipo e quantidade da microbiota ao seu redor. Porém, não encontraram diferenças significativas nas diversas conexões testadas. Eles usaram exatamente o mesmo modelo de implante, com variação apenas

no tipo de conexão com a prótese, qual seja: hexágono externo, e cone interno. A diferença de perda óssea peri-implantar foi estatisticamente significativa, sugerindo que as modificações na crista são maiores nos implantes com hexágono externo, e a conexão de cone interno possibilitou maior estabilidade na crista.

Já com os implantes em ortopedia, o problema é que necessitam ser menos rígidos, para poder acompanhar a deformação fisiológica dos ossos (KIRMANIDOU, 2016).

❖ Falhas com implantes de titânio

As falhas com implantes de titânio são pouco comuns, com a literatura reportando índices de 0% a 6%. As causas podem ser agrupadas em 3 categorias: Forma (desenho industrial) do implante; Defeitos de fabricação; Defeito de colocação cirúrgica ou falha biomecânica na carga do implante (OSMAN, 2015).

Fratura de implantes, geralmente ocorrem com implantes de 3,75 mm de diâmetro feitos em titânio puro (OSMAN, 2015).

O afrouxamento de parafusos que retêm a prótese normalmente é causado por falha de planejamento da prótese, sobrecarga oclusal ou hábitos parafuncionais. As causas são fadiga do metal por ciclos de carga oclusal. Por sua vez, a aceleração da peri-implantite leva à absorção óssea marginal, o que vai diminuir a ancoragem do implante, implicando em maiores forças de torque que, por sua vez, levam à fadiga do implante. Isso é corroborado por estudos de MEV dos implantes fraturados, onde não são encontradas bolhas, nem outros defeitos estruturais dos implantes, o que afasta qualquer possibilidade de defeito de fabricação. Todas as falhas são correlacionadas a fadiga, que advém de concentração de esforços. Ainda, há a suspeita que o titânio absorva Hidrogênio do meio em que está, tornando-se menos resistente, e há a suposição de formação de corrente galvânica entre o titânio e metais não preciosos das restaurações sobre os implantes (OSMAN, 2015).

2.2 Ligas de Titânio

As ligas são as de Ti-6AL-4V normal e a de extra baixo valor intersticial (OSMAN, 2015). Dependendo da proporção de oxigênio e ferro, o titânio é classificado em graus: A liga de Titânio-Alumínio-Vanádio (Ti-6Al-4V), também conhecida como Ti6-4 ou Ti-grau 5, tornou-se muito utilizado em ortopedia e odontologia, por ter mais resistência mecânica que o titânio puro (KIRMANIDOU, 2016).

A liga de Titânio que é mais utilizada para a produção de implantes contém 6% de Alumínio e 4% de Vanádio. O aquecimento da liga melhora a resistência e todas as qualidades mecânicas e físicas, o que a torna excelente para implantes, por diminuir a densidade, aumentar a resistência à fadiga e à corrosão. Porém, torna a liga mais rígida que o osso humano. Não obstante, o módulo de elasticidade permanece próximo ao do osso humano, só sendo melhorada essa discrepância pelo uso do titânio puro (OSMAN, 2015).





Esse baixo módulo de elasticidade faz do titânio o metal de excelência, pois distribui melhor as cargas mastigatórias na inter-face osso-implante. (OSMAN, 2015)

Ligas sem Vanádio (Ti-6Al-7Nb e Ti-6AL-2,5Fe) foram desenvolvidas, pela suspeita de toxicidade do vanádio, bem como ligas sem Alumínio e outras com Nb, Ta, Zr e Pd. São ligas β com módulo de elasticidade mais próximo ao do osso. Enquanto o osso humano tem de 17-28 GPa na cortical e 0,5-3 GPa na parte esponjosa, as ligas tipo β têm 55-85 GPa de módulo de elasticidade (OSMAN, 2015).

O que dá excelentes qualidades ao titânio, é a camada de óxido que o reveste, TiO_2 , formado por uma reação espontânea do titânio em contato com o ar (KIRMANIDOU, 2016).

As ligas de titânio (assim como o zircônio) têm diferenças quanto à cristalografia, sendo classificadas em α , β , e $\alpha\beta$, sendo a α de estrutura metalográfica **hexagonal**, enquanto a β tem forma **cúbica**. Quando alumínio e vanádio são incorporados ao titânio é que vêm as fase. O Alumínio estabiliza a fase α e aumenta a resistência da liga, mas diminui sua densidade. Já o Vanádio estabiliza a fase β . A transformação alotrópica do titânio da fase α para β ocorre a 882 °C. A fase α - β pode coexistir, dependendo da faixa de temperatura na adição de alumínio ou vanádio (OSMAN, 2015). Ver Tabela 1, a seguir.

A combinação α - β é a mais utilizada para a fabricação de implantes (OSMAN, 2015).

TABELA 2	
Ligas de Titânio Ti-6Al-4V	
fase α	estrutura metalográfica hexagonal 
fase β	estrutura metalográfica cúbica 
Alumínio	estabiliza a fase α , aumenta resistência  , diminui densidade 
Vanádio	estabiliza a fase β

Entretanto, com a liga Ti-6AL-4V, partículas de alumínio são tóxicas, e as de vanádio, mutagênicas, tendo sido associadas a distúrbios neurológicos, osteomalácia e mal de Alzheimer (KIRMANIDOU, 2016).

Titânio exposto à cavidade oral por peri-implantite ou recessão gengival tem causado problemas com a sensibilidade térmica. Por esse e outros motivos, novos biomateriais isentos de metais, como a zircônia, estão sendo introduzidos na Implantologia odontológica como uma alternativa aos implantes metálicos (OZKURT, 2011).

Embora, hoje, hidroxiapatita e zircônia sejam usadas para implantes dentários, o titânio ainda é o material predominante (SAITO, 2014). Os implantes de titânio feitos de titânio puro ou liga de titânio são amplamente utilizados na cavidade oral, devido às suas qualidades excepcionais (ALTUNA, 2016), tais como resistência a ácidos, com uma camada estável de óxido de titânio (TiO₂), biocompatibilidade, estabilidade *in vivo* e excelente osteointegração (SAITO, 2014).

2.2.1 Novas ligas de Titânio

São confeccionadas em estrutura porosa. Parece haver indução óssea nos poros da superfície. Podemos ter dois tipos: Macroporos (>100 μ m) e microporos (~10 μ m) (KIRMANIDOU, 2016). Porém o tamanho ideal do poro para o crescimento celular e ósseo encontra respostas ambíguas e conflitantes em diferentes estudos. Chegou-se também a testar a interconectividade entre poros e seu efeito no crescimento ósseo.

Foram criadas até fórmulas matemáticas para se calcular a resistência e módulo de elasticidade de implantes porosos. Entretanto, análise estrutural pelo método de elementos finitos nos dá um resultado mais real ao que acontece no organismo do paciente (PESSOA, 2017).

Titânio é o material mais usado para a fabricação de implantes dentais, o que conta com a confirmação de resultados favoráveis por estudos de médio e longo prazo. Se a sensibilidade ou alergia ao titânio é um tópico de relevância e merece mais estudos,

até o presente momento, permanece uma pergunta sem resposta (OSMAN, 2015), sendo necessárias pesquisas longas e minuciosas, sem interferência ou ligações com empresas que produzem implantes de zircônia.

2.3 Zircônia

A Zircônia é um material quimicamente estável com uma alta intensidade e tenacidade em comparação com outros materiais cerâmicos, como óxido de alumínio. Em odontologia, Y-TZP (um poliuretano de zircônia tetragonal estabilizado com ítrio a 3% mol.) é o material principal e tem sido amplamente utilizado como material de pino de reforço intra-canal para dentes tratados endodonticamente (SAITO, 2014), a fim de melhorar ou recuperar a resistência das raízes.

Os implantes de zircônia foram introduzidos na implantologia dentária como alternativa aos implantes de titânio. A zircônia parece ser um material de implante adequado por ser da cor do dente (OZKURT, 2011), Devido à sua cor branca, a zircônia também permite a fabricação de restaurações estéticas “*metalfree*” (anglicismo usado para determinar próteses que não tenham a cor metálica) que podem ser semelhantes à cor de dente (SAITO, 2014), suas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e baixa facilidade de adesão da placa microbiana (OZKURT, 2011). Em experimentos com animais, em diferentes modelos animais e diferentes condições de cargas, os autores encontraram índices médios de contato osso-implante superiores a 60%, o que corresponde a osteointegração de ótima qualidade. Estudos em cães mostraram aposição óssea direta sobre implantes de zircônia, com contato osso-implante de 81,9% nos implantes sem carga, e 69,8% nos implantes com carga (AKAGAWA, 1993).

Além disso, sua excelente biocompatibilidade e propriedades mecânicas superam muitas das deficiências dos implantes metálicos e permitem que a zircônia seja usada como o intermediário/*abutment* entre dentes (coroa) e os implantes. No Japão, o uso de pilares de zircônia foi autorizado pela Lei de Assuntos Farmacêuticos em 2005. Para melhorar as propriedades mecânicas do Y-TZP, um complexo de policristalina de zircônia tetragonal estabilizada com cerâmica de óxido de alumínio (nome comercial: *NANOZR*) foi recentemente estudado como material para implante (SAITO, 2014).

Há vários estudos recentes sobre implantes de zircônia com índices de sucesso de 74% a 98% entre 1 e 5 anos de acompanhamento pós-operatório, e 79,6% a 91,6%

depois da prótese instalada. Todavia, os autores enfatizam a necessidade de estudos abrangentes e bem controlados numa população maior, para que a zircônia possa ser indicada como substituta do titânio (OSMAN, 2015).

Biomateriais são hipoalergênicos e menos propensos a causar sensibilidade (SAITO, 2014), porém, as cerâmicas são susceptíveis ao envelhecimento, conhecido como Degradação à Baixa Temperatura, que consiste na lenta transformação superficial pela passagem dos cristais tetragonais meta-estáveis para a estrutura estável monoclinica na presença de água ou vapor de água (OSMAN, 2015), ou seja, no organismo humano, em contato com fluidos orgânicos, como sangue, saliva, linfa ou líquido intersticial.

As cerâmicas surgiram na odontologia como recobrimento de implantes de titânio (Fig. 5). Fosfato de cálcio (hidroxi-apatita, flúor-apatita) e biovidro são bioativas, enquanto óxido de alumínio (Alumina) e óxido de zircônio (Zircônia) são inertes. (OSMAN, 2015),

A despeito da idéia generalizada sobre cerâmicas bioativas serem mais osteocondutivas que as inertes, há evidências de degradação e desprendimento delas do corpo. Mesmo assim, a Zircônia goza de grande prestígio, por sua qualidade de propriedades mecânicas (OSMAN, 2015).



Fig. 5 – Implantes de dente (acima) e de articulações ósseas (abaixo) recobertos por zircônia.

São somente três os tipos de zircônia utilizadas em Odontologia:

- a) Zircônia policristalina tetragonal estabilizada com ítrio (3Y-TZP)
- b) Zircônia reforçada por alumina (ATZ)
- c) Alumina reforçada por zircônia (ZTA) (OSMAN, 2015).

- a) A microestrutura da cerâmica 3Y-TZP consiste em até 98% de grânulos tetragonais (0,2 - 0,5 μm), algumas vezes combinada com traços da fase cúbica, e 3 mol% de ítria (como estabilizante). As propriedades mecânicas dessa zircônia dependem do tamanho dos grânulos, que vai depender da temperatura de sinterização. Com grânulos maiores que 1 μm são menos estáveis e mais propensos a transformação para estrutura monoclinica (OSMAN, 2015).

A Y-TZP é a zircônia policristalina tetragonal estabilizada por Ítria (óxido de Ítrio) que tem alta resistência à abrasão, resistência à corrosão e resistência à flexão (800-1000 MPa) maior que outras zircônias (OSMAN, 2015).

Grãos menores que 0,2 μm são menos passíveis a transformação, o que reduz a resistência a fratura. A temperatura de sinterização pode variar de 1350 a 1550 °C. Resumindo: tamanho dos grãos e faixa de temperatura e tempo de sinterização levam a diferentes resultados e podem variar de fabricante para fabricante. O corte de zircônia macia a e posterior sinterização em alta temperatura previne a transformação de tetragonal para fase monoclinica – a menos que sejam feitos ajuste e jateamentos – Por outro lado, a fresagem de zircônia dura leva a possíveis fraturas e degradação a baixa temperatura. (OSMAN, 2015).

Traços de alumina melhoram a estabilidade e durabilidade, porém pioram a translucidez da zircônia.




- b) Alumina reforçada com zircônia e infiltrada com vidro (ZTA)

São cerâmicas de zircônia combinadas com uma matriz de alumina (Al_2O_3)

É uma mistura de Zircônia com Alumina *in-ceram*. O resultado é uma maior resistência final, entretanto o processo de sinterização leva a uma contração da ordem de 25% (OSMAN, 2015).

c) Zircônia reforçada por Alumina (ATZ)

É um material cerâmico composto, consistindo de uma mistura de 20% em peso de Alumina, 80% em peso de Zircônia, e 3 mol% de Ítria. É a zircônia que tem maior resistência à flexão (OSMAN, 2015).

TABELA 3		
temperatura	Cristalografia da Zircônia	ZrO ₂
até 1170 °C	forma cristalográfica monoclínica	
1170 °C- 2370 °C	forma cristalográfica tetragonal	
acima 2370 °C	forma cristalográfica cúbica	

Em condição de pressão ambiente, se houver variação de temperatura, a zircônia pode assumir diferentes formas cristalográficas (conforme a Tabela 3):

- ❖ Em temperatura ambiente e até 1170 °C, a Zircônia tem estrutura Monoclínica.
- ❖ De 1170 °C a 2370 °C, a estrutura é Tetragonal.
- ❖ E acima de 2370 °C até o ponto de fusão, a zircônia tem forma Cúbica (OSMAN, 2015).

Essas transformações podem acarretar um aumento de volume de aproximadamente 4.5%. Já o processo de sinterização leva a uma diminuição do volume de aproximadamente 20%. A sinterização resulta numa estrutura mais estável (OSMAN, 2015).

As falhas em zircônia podem ser químicas, no ato cirúrgico de colocação do implante, ou na carga excessiva da prótese (OSMAN, 2015).

Diferentemente do que ocorre com o titânio, defeitos de fabricação e tratamento de superfície podem influenciar negativamente a resistência do implante de zircônia, por alterar a conformação cristalográfica dessa superfície. Até mesmo a conformação geométrica de uma espira, ou o torque necessário na colocação em osso mais cortical podem acarretar concentração de forças, e vir a comprometer o sucesso do implante de zircônia (OSMAN, 2015).

Novos biomateriais isentos de metais, como a zircônia, estão sendo introduzidos na Implantologia odontológica como uma alternativa aos implantes metálicos (OZKURT, 2011). Embora o Zircônio seja um metal de transição (segundo a Tabela Periódica – Fig. 2), muitos não consideram a Zircônia (óxido de zircônio) como sendo um metal e sim uma cerâmica. Dependendo da sua configuração molecular espacial, a

zircônia pode alterar drasticamente suas características, sendo inclusive usada em joalheria, como substituto ao diamante (ver zircônia cúbica na Tabela 2).

Um estudo prospectivo de implantes de uma peça de zircônia com superfície rugosa mostram sucesso de 92% a 95%, numa observação de 2 e meio a 5 anos, com excelente estética. Igualmente, outro grupo reporta sucesso de 96,5% em implantes de zircônia em pacientes parcialmente desdentados (OSMAN, 2015).

Por outro lado, um estudo longitudinal de corte (*cohort*) com avaliação clínica e radiográfica não conseguiu confirmar os dados acima, para implantes em peça única de zircônia. Os resultados foram semelhantes para implantes com carga imediata tanto de titânio quanto de zircônia no acompanhamento por 1 ano. Porém a perda óssea de mais de 2 mm detectada em exames radiográficos nos implantes de zircônia não puderam permitir a indicação desses implantes para uso clínico (KOHAL, 2012).

Pesquisas prospectivas mais recentes confirmaram a perda óssea maior ou igual a 2 mm ao redor dos implantes de zircônia (OSMAN, 2015).

Os implantes de zircônia parecem ser promissores. Porém, ainda são necessários mais estudos laboratoriais e clínicos, antes que uma recomendação abrangente possa ser feita. Como a zircônia continua sendo uma cerâmica sujeita a lascas, trincar e fraturar, com significantes imperfeições de superfície, o uso de implantes de pequeno diâmetro (3,25 mm.) feitos em zircônia deve ser evitado (OSMAN, 2015).

2.4 Titânio-Zircônia (Ti-Zr)

Biomateriais como Titânio puro e ligas de titânio são amplamente utilizados em medicina e odontologia e, dependendo do seu uso pretendido, devem satisfazer a muitas exigências. Esta seleção é feita com base na forma, propriedades mecânicas, propriedades químicas e biocompatibilidade, (ELIAS, 2015-1) (OZKURT, 2011) (SAITO, 2014), bem como na estética.

Em 2006, Degidi et al. encontraram menor número de bactérias, menor infiltrado inflamatório (menos neutrófilos), menor formação micro-vascular e menor produção de óxido nítrico (HClO₃) ao redor dos cicatrizadores gengivais de zircônia, quando comparados aos de titânio. Recentemente, foram relatados vários problemas com o uso

de titânio, tais como traços metálicos pós-transplante encontrados em órgãos ou gânglios linfáticos e hipersensibilidade ao titânio (SAITO, 2014).

Embora o sucesso dos implantes de titânio esteja bem documentado (OSMAN, 2015) (ALTUNA, 2016), foi lançado um implante de liga de Titânio-Zircônio (com nome comercial Roxolid) feito pela combinação desses dois elementos altamente biocompatíveis e com maior resistência mecânica que o titânio, alcançando os mesmos níveis de sucesso (>95%) que implantes de titânio de diâmetros maiores (Al-NAWAS, 2015 ; ALTUNA, 2016; BADRAN, 2017). Implantes estreitos são aqueles com diâmetro igual ou menor que 3,5 mm. Embora os resultados da liga Ti-Zr sejam muito promissores, os acompanhamentos a longo prazo se fazem necessários, pois, dos estudos feitos até abril de 2017, o período mais longo estudado foi de 60 meses (5 anos) (BADRAN, 2017). Recentes estudos com animais sugerem que os implantes Ti-Zr sejam mais biocompatíveis que os de Titânio e, assim, podem vir a se tornar o padrão ouro quanto ao uso de implantes de menor diâmetro (BADRAN, 2017)

A liga de Titânio-Zircônio (*Roxolid*[®]) tem composição aproximada de 85% de Titânio e 15% de Zircônio. Embora o módulo de elasticidade não tenha sido divulgados, os fabricantes informam que melhores características de resistência que o titânio puro e suas ligas, mostrando resistência à tração de 953 MPa e resistência à fadiga de 230 N (conforme testes ISO 14801) (OSMAN, 2015).

Testes biomecânicos *in vivo* mostraram que a força de torque para remoção dos implantes Ti-Zr são ligeiramente maiores (231 Ncm) que as para remover implantes de titânio (205 Ncm) (BERNER, 2009).

Embora a propaganda dos implantes cerâmicos bata muito forte na tecla da hipersensibilidade e alergia a metais, as evidências científicas reportadas são muito pequenas e isoladas. Os íons metálicos liberados pelos implantes em contato com a gengiva podem formar complexos proteicos que causem alergia. Com implantes que não deram sucesso, em animais, foram encontrados traços de titânio nos tecidos circunvizinhos, linfonodos e pulmão. E, em um paciente com problemas num implante de quadril, foi encontrada elevação da taxa de titânio no sangue (OSMAN, 2015).

A literatura científica é pobre na demonstração de alergias a titânio, os resultados são conflitantes e não conclusivos (OSMAN, 2015).

Em 2015, Al-Nawas e colaboradores realizaram pesquisa envolvendo 603 implantes de menores dimensões de liga de titânio-zircônia (liga Ti-Zr com maior resistência à fadiga) que foram colocados em 357 pacientes, em diferentes países. O

índice de sucesso foi de 97,6 % após 2 anos, e o sucesso sem perda óssea marginal foi de 97,4%, o que representa um resultado excelente tanto em perdas de implantes quanto à perda óssea, para implantes de 3,3 mm de diâmetro.

Implantes estreitos de Ti-Zr podem substituir até molares unitários, sem necessidade de enxerto, o que simplifica e torna o tratamento mais acessível (BADRAN, 2017).

O uso de implantes de titânio tem alto nível de sucesso e está muito bem documentado (ALTUNA, 2016) (OSMAN, 2015).

As ligas de titânio-zircônio congregam dos materiais altamente biocompatíveis e demonstraram maior resistência mecânica que os implantes de titânio comercialmente puro. Numa revisão de 922 implantes mais estreitos de Ti-Zr mostraram o mesmo sucesso (>95%) que os implantes de titânio de diâmetro normal (ALTUNA, 2016).

JUTIFICATIVA

Os implantes de titânio foram os primeiros a ser usados com bases científicas, trazendo uma solução para a reabilitação da perda dental causada por processo biológico ou traumático. Embora os implantes de titânio representem o procedimento de maior sucesso estatístico em toda a ciência odontológica (OSMAN, 2015)(AL-NAWAS, 2015)(ALTUNA, 2016), há controvérsias quanto ao seu uso seja em relação ao desprendimento de partículas e ions (KIRMANIDOU, 2016), seja pela busca da superfície ideal, seja pelo risco de toxicidade de elementos incorporados na liga, como o vanádio e o alumínio (KIRMANIDOU, 2016).

O óxido de zircônio – a zircônia – tem sido apresentado como uma alternativa segura ao titânio, mas ensaios experimentais têm mostrado resultados conflitantes (OSMAN, 2013), sendo que vários autores recomendam estudos mais bem controlados para que a zircônia possa ser indicada em seres humanos (OSMAN, 2015).

Quanto às novas ligas de titânio-zircônio, Badran e colaboradores (2017) sugerem que devam se tornar o padrão ouro, quando se trata de implantes de menor diâmetro, pela resistência e melhor biocompatibilidade (AL-NAWAS, 2015) (BADRAN, 2017), porém, numa extensa revisão bibliográfica, a equipe de Osman (2015) sugere cautela na indicação de implantes de zircônia em seres humanos, por falta de uma literatura de pesquisa mais robusta.

É pouco o conhecimento sobre os mecanismos de adesão, espalhamento e ativação dos leucócitos em contato com diferentes superfícies de titânio.

Como primeira linha de defesa imunológica do organismo os neutrófilos são rapidamente recrutados para as áreas onde o titânio e zircônia são implantados, interagindo com esses biomateriais.

Entretanto, poucos relatos avaliam a interação dos neutrófilos humanos com o titânio.

Já se sabe que tal ativação é desencadeada, mas os mecanismos ainda não estão completamente esclarecidos, nem foi completamente descrito o contato direto entre a superfície de óxido de titânio com os neutrófilos.

Não são conhecidos estudos avaliando neutrófilos sobre superfícies de zircônia.

OBJETIVOS

Sabe-se que os leucócitos neutrófilos sofrem ativação direta pelo contato com o titânio – sem outros mediadores nem “cross-talk” – o presente estudo visa a compreender melhor a ativação, pela comparação de neutrófilos quiescentes com neutrófilos ativados por esse contato com o titânio e a zircônia.

Geral:

- Analisar a influência do contato com superfícies de titânio e zircônia na ativação de neutrófilos.

Específicos:

- Comparar a reação das células e descrever as alterações morfológicas de superfície de neutrófilos consequente à ativação por contato com superfícies de titânio, e de zircônia sinterizada e não sinterizada.
- Comparar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) de neutrófilos quiescentes com neutrófilos ativados após o contato com superfícies de titânio, de zircônia comum e de zircônia sinterizada.

MATERIAIS E MÉTODOS

❖ **Indivíduos** / Pacientes / Replicatas técnicas

Utilizamos modelos vivos, humanos, para a doação de neutrófilos. No dia de cada experimento, amostras de 20 mL de sangue periférico foram colhidas de oito adultos jovens, saudáveis, do sexo masculino, após assinatura do Termo de Consentimento, e preenchimento de Questionário de Saúde.

Dos oito paciente coletados para experimentos válidos, as idades variaram de 21 a 28 anos, com média de idade de 24 anos e 10 meses. Essa seleção restrita visou a evitar coleta de neutrófilos imaturos, ou senescentes, que não respondem prontamente no processo inflamatório. E somente homens, para se evitar interferências do ciclo hormonal feminino. Também excluímos indivíduos com qualquer condição patológica aguda e alergias, para se evitar neutrófilos em número aumentado ou ativados por condições estranhas ao experimento.

Obtivemos uma média de 450 μL de solução com células, todas com mais de 10^6 células, segundo contagem em câmara de Neubauer, e foi feita idêntica diluição em todos os experimentos com 6.667 células por μL de solução. Alíquotas de 30 μL com neutrófilos foram aplicados sobre superfícies das 4 condições testadas.

❖ **Condições**

Foram confeccionados discos das amostras de titânio, zircônia comum, zircônia sinterizada e polipropileno (controle).

Controle positivo - Os discos de titânio de 5,5 mm de diâmetro por 3 mm de espessura foram produzidos a partir de uma barra de liga de Titânio-Alumínio-Vanádio – grau IV– fornecida pela firma *Consist Implantas*.

Os discos de zircônia foram produzidos a partir de bolachas *Dental Zirconia Blank* (Alemanha) discos de 5,5 mm de diâmetro por 3 mm de espessura e outros de maior diâmetro, para que, após sinterização ficassem com 5,5 x 3 mm.

A sinterização foi feita no laboratório *Proceram*, em forno a 1.800 °C por 10 horas, o que resulta numa enorme resistência bem como numa contração de 20% nas medidas das amostras.

Controle negativo - Os discos de controle foram feitos de polipropileno de tampa de microtubos Eppendorf de 600 μL cortada em círculo de diâmetro de 5,5 mm.

Antes de cada experimento, todos os discos foram lavados e esterilizados em autoclave.

❖ Metodologia

Preliminarmente, foram realizados teste de caracterização tanto dos discos de titânio quanto dos discos de zircônia, para se conhecer as imagens de superfície de ambos, bem como a constituição química das amostras.

Na manhã de cada experimento, foram coletados 20 ml de sangue periférico de um doador, com seringa de plástico com agulha de 0,7 mm (25/7) por aspiração lenta. Foi usado anticoagulante em quantidade somente para preencher a agulha (Hepamax – heparina sódica 5000 UI /mL – marca Blau, lote 16020881, validade 02/2018).

Para se separar os neutrófilos, foi utilizado o protocolo desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa em Proteômica de Neutrófilos da Universidade de Brasília:

Em cabine de fluxo laminar, foram preparados gradientes de Percoll, de 60% e 70%, em tubo Falcon de 50 mL.

Para doadores do sexo masculino, o preparo é feito como na tabela seguinte:

Reagentes		60%	70%
1°	Água milli-Q	3.600 μL	2.400 μL
2°	HBSS 10 X	1.200 μL	1.200 μL
3°	Percoll 100%	7.200 μL	8.400 μL
volume final:		12 mL	12 mL

Tabela 4 – Preparação dos gradientes de Percoll

Após preparados, o gradiente de 60% é cuidadosamente pipetado e gotejado sobre o de 70%. Uma vez montados os gradientes, coletou-se o sangue.

Sobre o gradiente de Percoll, foram adicionados 12 mL do sangue coletado (Fig. 7). O conjunto foi centrifugado à temperatura ambiente a 1.300 rpm (200 rcf=g) por 15 minutos em centrífuga Hettich. Por esse procedimento, neutrófilos ficam retidos na “malha” de percoll, algumas vezes num halo bem evidente, mais próximo à zona de hemácias (figs. 6, 7 e 8). O soro e zona de mononucleados são descartados e toda a zona

de percoll é pipetada para dois tubos menores (Falcon de 15 mL) (Fig. 23), quando todo tratamento dos neutrófilos passa a ser feito à temperatura de 4°C, para se prevenir a ativação dos mesmos.

Em um outro Falcon são colocados 6 mL de sangue, para se centrifugar e colher o plasma do doador.



Fig. 6 - Sangue sobre os gradientes de Percoll; Fig. 7 - Após a 1ª centrifugação, evidenciam-se (de cima pra baixo): Soro e nuvem de mononucleados, nuvem de polimorfonucleados, e precipitação das hemácias.

Para eliminação do percoll por lavagem com HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution - Sigma*), completam-se os Falcons até as marcas de 14 mL com HBSS 1x gelado, e centrifuga-se a 1.600 rpm (300 rcf=g) a 4°C.

Repete-se o procedimento por 2 vezes e tenta-se visualizar o sedimento (*pellet*), sendo as duas alíquotas juntadas em um único Eppendorf de 6 mL e, subsequente, é feita a eliminação de eritrócitos contaminantes, por hemólise com 3 mL de água milliQ gelada, por 25 segundos, sendo a osmolaridade restabelecida pela adição de 3 mL de HBSS 2x. Se ainda restar hemácias, procede-se a uma segunda hemólise e igual centrifugação a 1.600 rpm (300 rcf=g) por 5 minutos a 4°C.

Dessa forma, conseguimos separar os neutrófilos do sangue total (Figs. 23 e 24), segundo protocolo aprimorado pelo Grupo de Pesquisa em Proteômica de Neutrófilos da UnB (vide Apêndice A)(Fig. 25).

Dos oito experimentos válidos, obtivemos de 380 a 490 µL de solução final com células, numa média de 450 µL, todas com mais de 10⁶ células, segundo contagem em câmara de Neubauer (Fig. 26).

Teste de Viabilidade: Em um microtubo Eppendorf foram colocados 45 μL de Azul de Tripán, e adicionados 5 μL da solução de células. Dessa solução foram retirados 10 μL e colocados num lado da Câmara de Neubauer, para contagem.

Teste de Pureza: da mesma solução de células, foram retirados 2 μL para aplicar na lâmina, corar com Panóptico, para contagem em microscopia óptica com óleo de imersão e aumento de 1.000 x (conforme protocolo detalhado no Apêndice A) (Fig. 25).

Após esses cálculos para otimização da concentração de neutrófilos, a diluição obtida foi idêntica em todos os experimentos com 6.667 células por μL de solução. Alíquotas de 30 μL com neutrófilos foram aplicados sobre superfícies de titânio, zircônia, zircônia sinterizada e controle, sendo a condição controle de discos feita de tampa de micro-tubo Eppendorf .

Na fase de ativação, voltou-se a trabalhar na temperatura ambiente, quando as alíquotas de neutrófilos receberam plasma do paciente, para se permitir contato com Cálcio e Magnésio, essenciais para que os neutrófilos possam se ativar. Ainda, quando aplicados sobre os discos, todo o conjunto foi aquecido durante 1 (uma) hora à temperatura de 37°C em um aparelho Termomixer Mixing Block MB-102, para se mimetizar as condições presentes no corpo humano.

Após 1 hora a 37°C na ativação por contato, o conjunto foi invertido em um microtubo maior (1,5 mL) com HBSS e centrifugado a 1500 rpm (239 rcf=g) por 15 minutos à temperatura ambiente (22°C), para se separar os neutrófilos fortemente aderidos daqueles fracamente aderidos ou somente depositados sobre as superfícies dos discos, conforme descrito por Campos-Silva e colaboradores (2014).

Para a ativação, nos 8 experimentos foram usados 96 discos, sendo 12 por experimento, nas 4 condições, titânio, zircônia, zircônia sinterizada e disco controle, sendo 1 disco para cada uma das finalidades:

Teste de NBT (nitroblue tetrazolium), para produção de EROs,
exame por MEV, e
preparo para proteômica.

Anteriormente, os microtubos eram invertidos em solução HBSS dentro de um tubo Falcon de 15 mL (Fig. 9), quando eram levados à centrifugação, porém, com um total de 12 tubos, a centrifugação tinha que ser realizada em duas etapas. Conseguimos, com o corte também na extremidade junto à tampa do Eppendorf pequeno, acondicioná-lo dentro de um Eppendorf maior, o que veio a economizar solução e a permitir a

centrifugação em conjunto de todas as amostras do experimento (Fig. 10) numa mesma centrífuga.

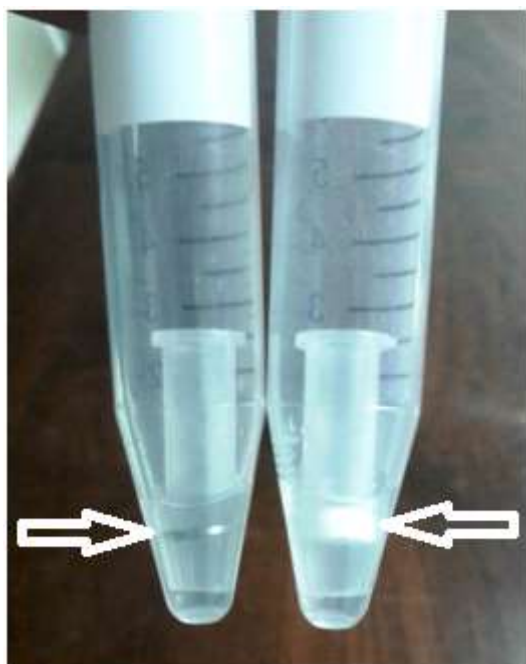


Fig. 9 – Teste de Eppendorfs cortados contendo discos de titânio e zircônia (setas) e invertidos dentro de tubos Falcon de 15 mL para a centrifugação.

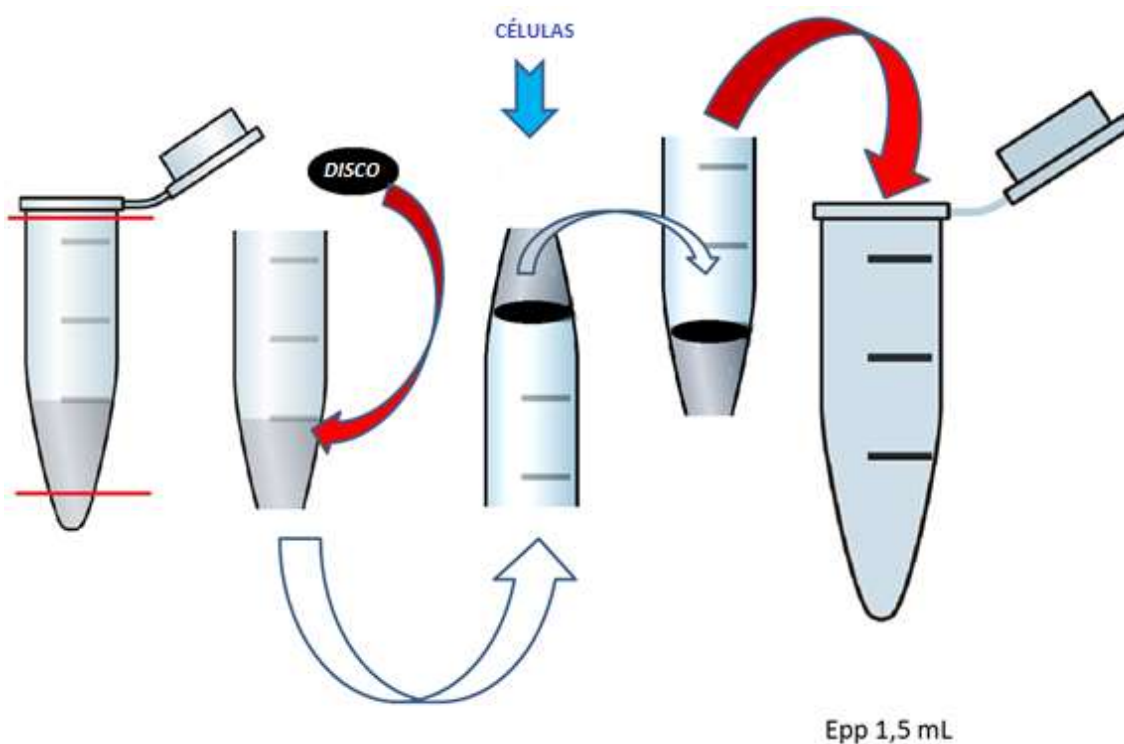


Fig. 10 – Resumo do desenho experimental: Cortes no Eppendorf de 600 μ L; Eppendorf cortado recebe o disco de Titânio, Zircônia, Zircônia sinterizada ou Controle; invertido recebe as células por sobre o disco. Após 1 h. de incubação, é desinvertido e colocado num Eppendorf de 1500 μ L e o conjunto centrifugado. Cortando-se as duas extremidades do micro-tubo pequeno é possível acondicioná-lo dentro de um Eppendorf de 1500 μ L o que facilita a centrifugação de várias amostras ao mesmo tempo.



Fig. 11 – Discos posicionados dentro dos Eppendorfs com a ponta cortada, acondicionados no Termomixer Mixing Block MB-102, a 37°C recebendo as alíquotas de células para dar início ao processo de ativação.

❖ NBT lâmina:

A incubação para ativação é interrompida aos 40 minutos, para se colocar 10 μL de DMSO + NBT sobre 1 disco de cada condição, pois o NBT deve agir por 20 minutos, completando-se assim 1 hora de incubação.

Após essa 1 hora, foram colhidas alíquotas para os testes de NBT lâmina e NBT colorimétrico. 2 μL de solução com células foram colocadas sobre lâminas para microscópio, que foram encubadas ao abrigo da luz, sob atmosfera umidificada por 20 minutos em câmara úmida a 37°C. Após isso, foram coradas por safranina e examinadas ao microscópio óptico (Prancha 1).

❖ NBT colorimétrico:

Após a ativação, o teste de nitroblue tetrazolium (NBT) mostrou-se eficiente na análise tanto de neutrófilos quiescentes quanto de ativados (DA ROSA, E.L.S., 2014). Para saber se o neutrófilo foi realmente ativado, mede-se sua capacidade de ingerir e

matar microorganismos. Como ensaios para se avaliar essas atividades são muito complicados, faz-se uma avaliação indireta, medindo-se a produção de EROs (VIRELLA, 2007).

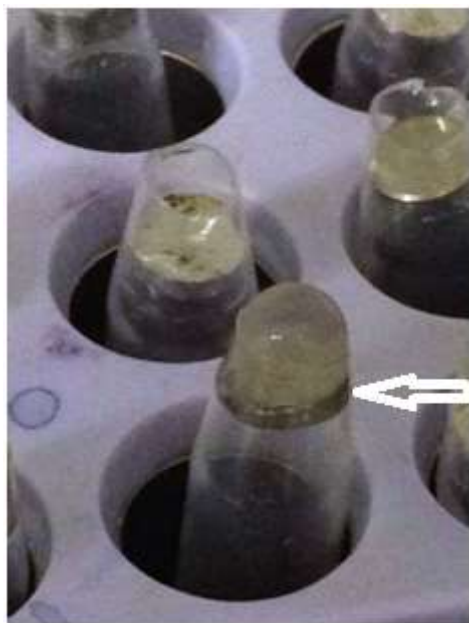


Fig. 12 – Detalhe das células sobre um disco de Ti.

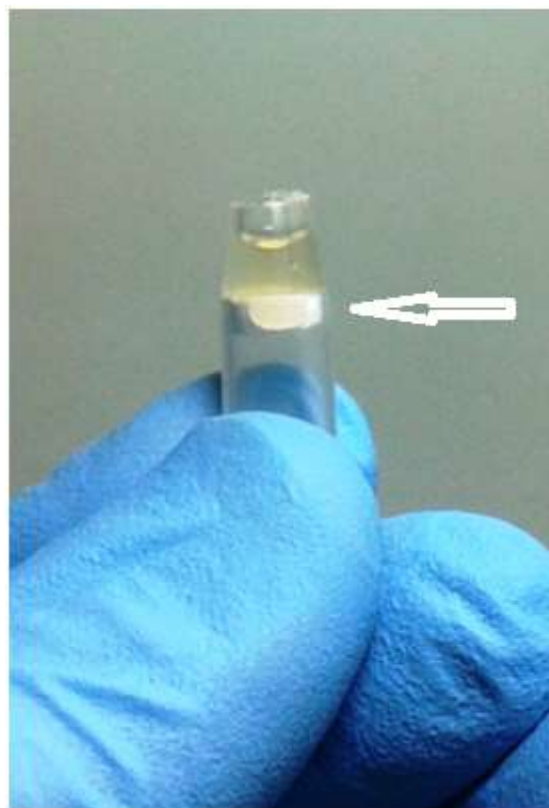


Fig. 13 – Células sobre disco de zircônia (seta).

Cloreto de 4-Nitro azul tetrazolium ou cloreto *p*-Nitrotetrazolium azul tem fórmula linear $C_{40}H_{30}N_{10}O_6 \cdot 2Cl$ e massa molecular 817,64 u, sendo incolor ou ligeiramente amarelado que, quando reduzido pelos neutrófilos, se torna azul marinho pela formação de cristais de formazan (SIGMA-ALDRICH, 2017)(VIRELLA, 2007).

A redução do NBT pode ser utilizada como marcador indireto da atividade de produção de EROs pelos neutrófilos e monócitos. Com o NBT sendo convertido a precipitado de Formazan, a contagem foi feita por visualização direta de grânulos ao microscópio óptico, avaliando-se a presença de coloração azulada ou enegrecida consequente à redução do NBT intra-citoplasmática. O NBT é um corante que gera um produto intensamente corado, o Formazan. O NBT é facilmente captado pelos neutrófilos e é reduzido no interior da célula (NEVES, A.C.D., 2010) (DA ROSA, E.L.S., 2012). Embora a contagem dos grânulos azuis de Formazan seja um método efetivo, não deixa de ser muito subjetivo. Por isso, deve ser validado por estudo

colorimétrico, medindo-se a absorvância em diversos comprimentos de onda, que é um teste muito sensível e preciso (VIRELLA, 2007).

Foram coletadas amostras e colocadas em placas de Elisa e levadas ao espectrofotômetro, fazendo-se leituras de comprimento de ondas que variaram de 350 a 790 nm, com intervalos de 5 nm. Especial atenção foi dada à leitura de 515 nm, considerada por Virella (2007) como o pico de absorvância do NBT reduzido para neutrófilos.

❖ MEV:

Após a centrifugação, tanto os discos quanto as células desprendidas foram levadas a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) JEOL JSM 7001.

O microscópio eletrônico de varredura é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise das características microestruturais. Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução com a fonte de luz branca. Apresenta como característica a alta resolução onde estruturas da ordem de nanômetros (1 nm a 20 nm) podem ser analisados por MEV com uma aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. O princípio de um microscópio eletrônico de varredura consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a um sistema eletrônico de captura de imagem. A análise por M.E.V. permite avaliar a estrutura morfológica dos neutrófilos, caracterizando sua superfície tanto no estado quiescente quanto no estado ativado (DA ROSA, E.L.S., 2012).

Após a centrifugação, os discos foram removidos dos microtubos e fixados por solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5%), por 24 horas. No dia seguinte, o fixador foi substituído por tampão Cacodilato de sódio a 0,1 M, e no dia seguinte, o tampão foi aspirado e adicionada (em capela) uma gota de tetróxido de ósmio por 30 minutos. Após, remoção do ósmio, As células dos sedimentos foram coladas sobre lamínulas de 18 x 18 mm com poly-L-lisina, as lamínulas colocadas no suporte e, tanto lamínulas quanto discos, desidratados por banhos de acetona por 5 minutos em cada uma das concentrações crescentes a 50%, 70%, 90% e duas vezes a

100%, após o que foi realizada secagem por CO₂ no aparelho de Ponto Crítico da marca Balzers CPD 030 (Fig. 14).

Saindo da secagem ao ponto crítico, lamínulas e discos foram montados com fita condutora dupla-face sobre suportes de latão e levados à câmara de vácuo para a metalização por pulverização catiônica de ouro num metalizador Balzers SCD 050 (Figs. 15), após o que, foram analisadas no MEV JEOL 7001 - Hitachi.



Fig. 14 - Amostras em discos (seta horizontal) e lâminas (seta vertical) na câmara de pressão do aparelho de ponto crítico.

Na análise por dispersão de RX, o detector de raios-X e o MEV são concepções alternativas de projeto do mesmo instrumento básico, isto é, partem do mesmo princípio físico para resultados diferenciados. A análise por Dispersão de RX (EDS) permite a obtenção de Espectros de raios-X que determinam os elementos químicos presentes nas amostras de determinado neutrófilo (DA ROSA, E.L.S., 2012). Além da determinação dos componentes das amostras de titânio, também foram analisados os de zircônia (Figs. 19 e 20).

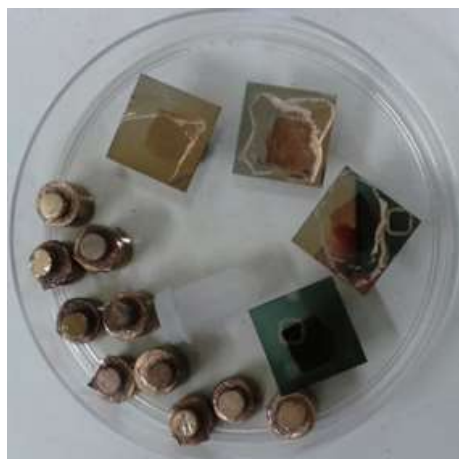


Fig. 15- Amostras após metalização por ouro (neutrófilos sobre discos e sobre lâminas).

Para se estudar a interação das células com as superfícies, desenvolvemos suportes inclinados e com a identificação gravada, o que, somado à inclinação de 10 a 30° que o MEV permite, conseguimos imagens por baixo das células (Figs. 16 e 17).

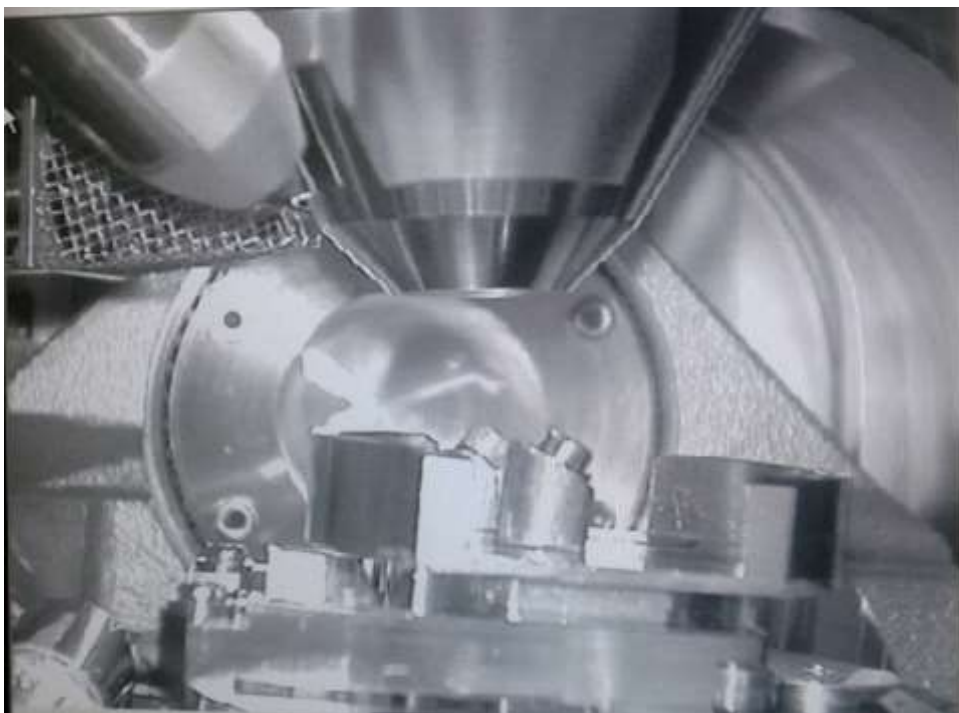


Fig. 16 – Com os suportes inclinados, somando-se à inclinação da plataforma móvel, conseguimos inclinações de quase 90°, o que possibilitou visualização da interação neutrófilo-superfície.

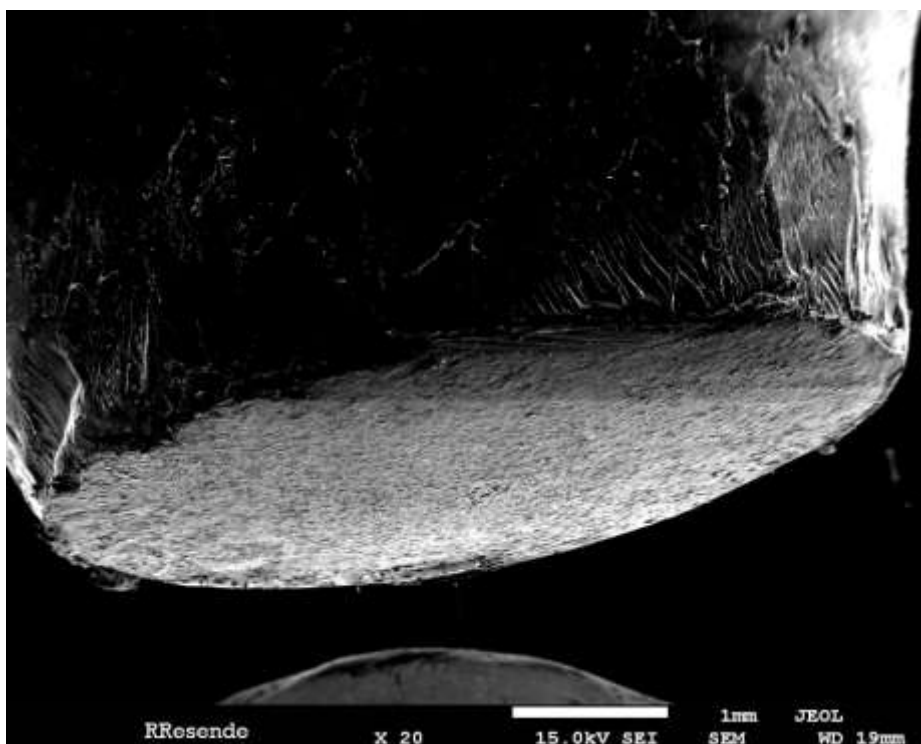


Fig. 17 – Amostra posicionada quase perpendicularmente ao feixe de elétrons, para a observação da interface células-superfície (note-se ao lado outra amostra em posição normal).

❖ Prepara de amostras para proteômica:

Também após a centrifugação, o Eppendorf pequeno foi retirado do grande, o sobrenadante aspirado e colocado junto com o sedimento do Eppendorf maior.

O Eppendorf menor foi cortado, para se remover o disco. O disco foi umedecido com tampão de lise. Os discos foram raspados com cinzel ou bisturi com lâmina 11, para remover as células fortemente aderidas. Todo o sedimento foi centrifugado a 5.000rpm (2655 rcf=g) por 15 minutos a 22°C, em centrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi pipetado, colocado num tubo Eppendorf, identificado e congelado a -80°C. O sedimento foi lavado 2 vezes com 1.000 µL de HBSS 1x (sem Ca e Mg), ressuspendido, centrifugado a 5.000 rpm (2655 rcf=g) por 15 minutos a 22°C. O sobrenadante foi descartado; o sedimento recebeu tampão de lise.

Resumindo, sobrenadante, sedimento e raspado, foram acondicionados em microtubos separados, tratados com tampão de lise para proteômica (SDS 2%; DTT 0,1 mol/L; inibidor de protease; inibidor de fosfatase; TEAB 0,02 mol/L), aquecidos a 80°C por 10 minutos no *Thermomixer*, sonicados com ultra-som de alta potência *Sonics Vibra Cell* com ponteira para *Eppendorf (tapered microtip)* por 5 ciclos de 15 segundos e pausas de 5 segundos, numa amplitude de 50%, o que corresponde a um total de 1 minuto e 15 segundos de sonicação, após o que os túbulos Eppendorf foram identificados e congelados a -80°C, para posterior estudo de proteômica.

Atualmente, estudos têm sido realizados para a obtenção de mapas proteômicos de neutrófilos quiescentes, estimulados e ativados, ou mesmo de estruturas subcelulares (DA ROSA, E.L.S., 2012). Porém, devida à exiguidade de tempo e de disponibilidade de equipamento (espectrômetro de massa), as amostras foram congeladas a - 80°C para uma posterior análise proteômica, que não foi possível no presente estudo.

No final dos experimentos, tínhamos as lâminas prontas para exames de pureza e NBT ; tubos com discos em fixador para exames de Microscopia Eletrônica de Varredura, e tubos de material lisado e sonicado , sendo esses últimos congelados a -80°C, para posterior Espectrometria de massa.

RESULTADOS

Foram realizados 3 experimentos preparatórios, para se definir os tipos de amostras, adequar os métodos e as análises, e 14 experimentos completos. Embora, alguns desses não tenham logrado êxito, por intercorrências durante a execução, ou por falha de equipamentos, ou indisponibilidade dos mesmos no momento necessário.

Assim, dos 8 experimentos válidos, pudemos recolher os resultados seguintes:

❖ Superfícies:

Existem normas ditadas pela Associação Norte-americana para Materiais e Testes (ASTM) (similar ao Inmetro brasileiro). Segundo ela, há 6 tipos de titânio para implantes: 2 ligas de titânio e 4 graus de titânio puro, que contêm algum traço de Carbono, Nitrogênio, Oxigênio e Ferro, e na caracterização de nossas amostras, por análise elementar por difração de raios X, EDS, acoplada ao Microscópio de Varredura Eletrônica, encontramos Titânio e Alumínio e Oxigênio, ou seja, nossas amostras de titânio são de composição compatível com Liga de Titânio de grau IV (Fig. 20).

Os exames por EDS dos discos de Zircônia mostraram composição de Zircônio e Oxigênio, ou seja, óxido de zircônio de alta pureza (Figs. 18 e 19).

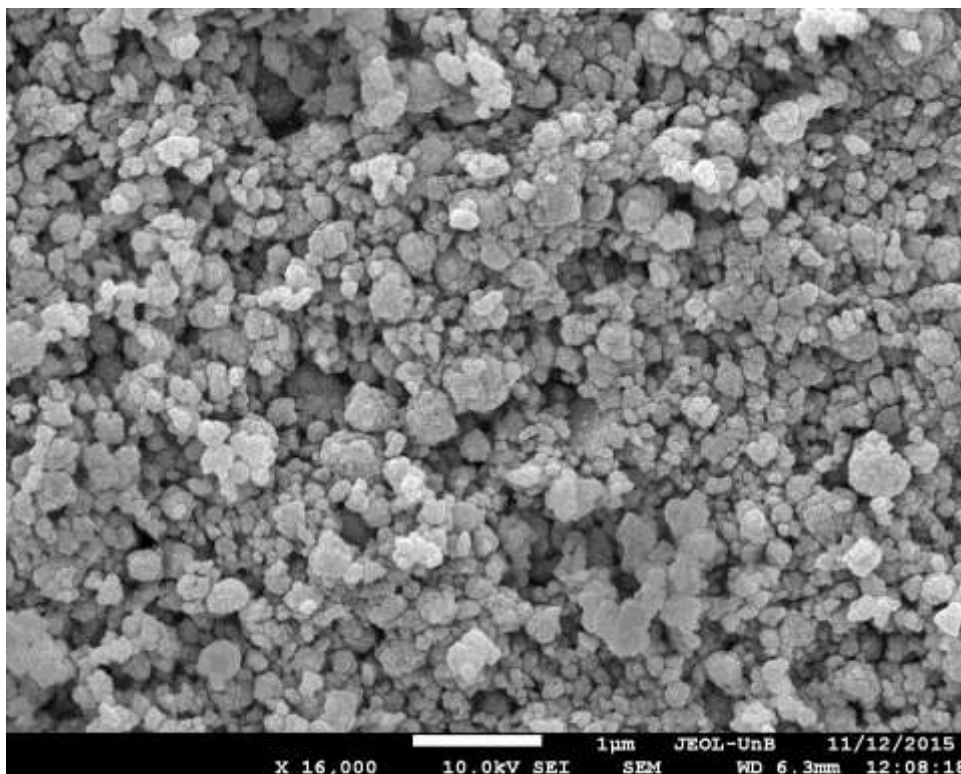
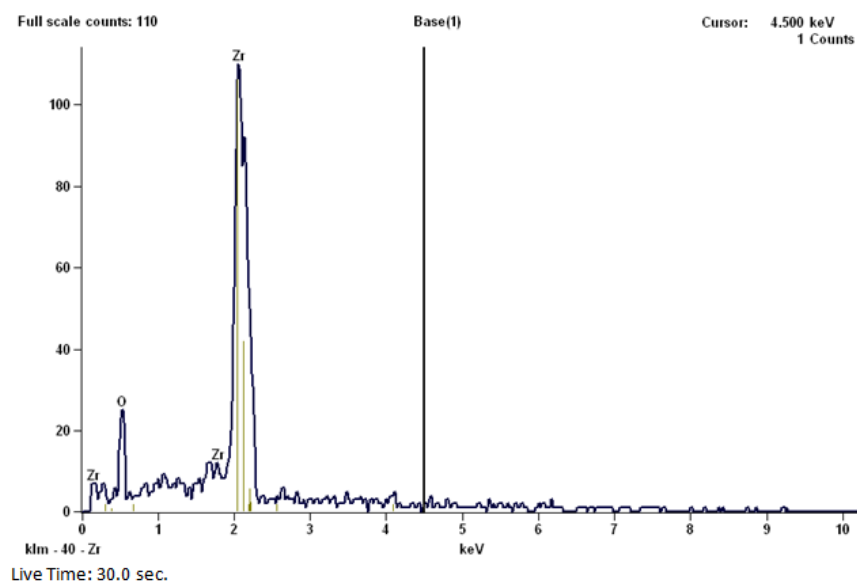


Fig. 18 - MEV de Zircônia ao aumento de 16.000 X

Project: Roberto



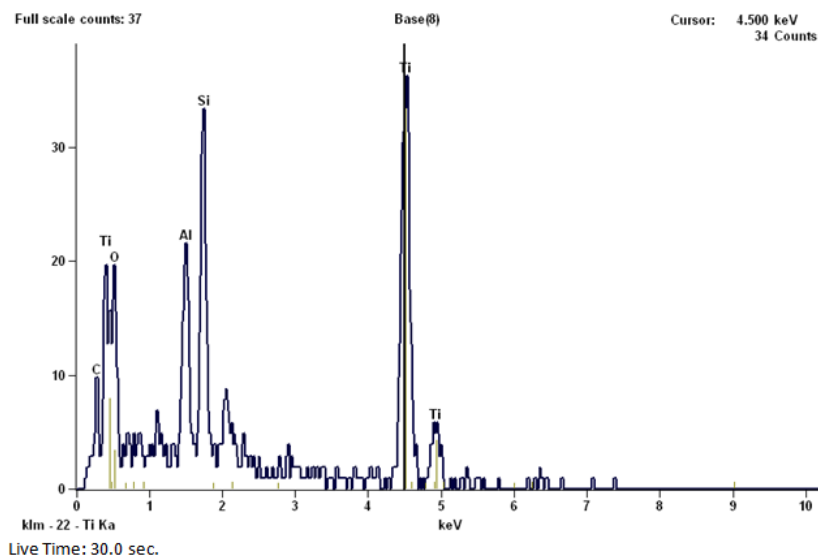
Acc.Voltage: 10.0 kV Take Off Angle: 39.1 deg.

Detector: UltraDry

Quantitative Results for: Base(1)

Element Line	Net Counts	Weight %	Atom %	Formula	Compnd %
O K	132	11.77	43.19	O	11.77
Zr L	1770	88.23	56.81	Zr	88.23
Total		100.00	100.00		100.00

Fig. 19 – Mesma amostra ao exame de EDS detectou-se Zircônia (óxido de zircônio) de alta pureza.



Acc.Voltage: 10.0 kV Take Off Angle: 41.2 deg.

Detector: UltraDry

Quantitative Results for: Base(8)

Element Line	Net Counts	Weight %	Atom %	Formula	Compnd %
C K	36	1.35	4.12	C	1.35
O K	68	8.27	18.92	O	8.27
Al K	188	5.55	7.53	Al	5.55
Si K	269	8.58	11.18	Si	8.58
Ti K	529	76.25	58.25	Ti	76.25
Total		100.00	100.00		100.00

Fig. 20 – Amostra da liga de titânio em exame por EDS. Compatível com liga de grau 4.

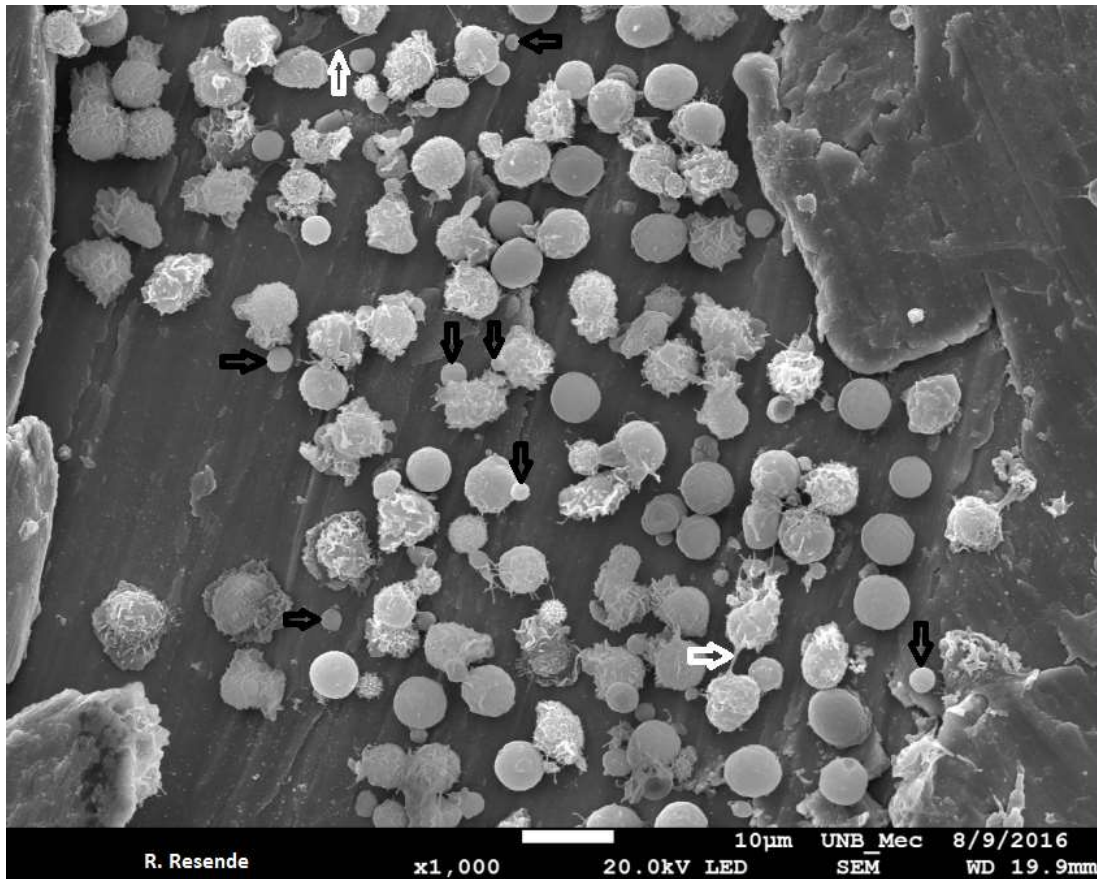


Fig 21 – Neutrófilos sobre superfície de titânio ao MEV com 1.000 x de aumento, mostrando diversidade morfológica, ativação com grande número de vesículas extracelulares, TNTs e NETs (setas)

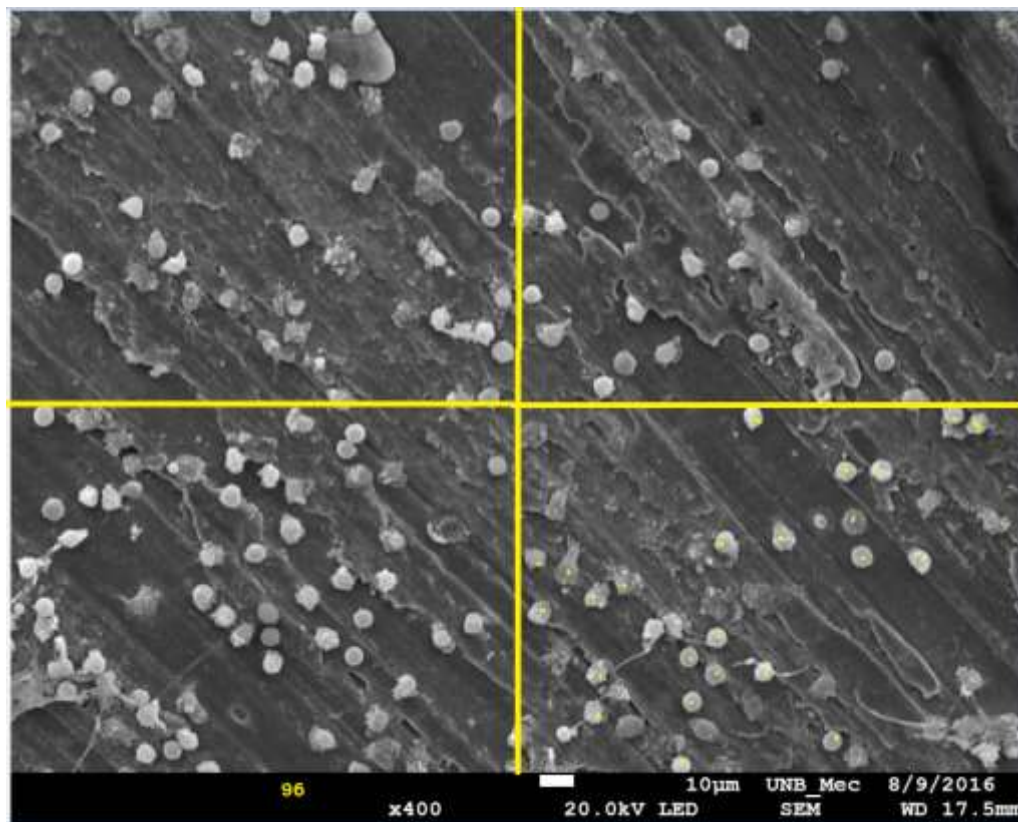
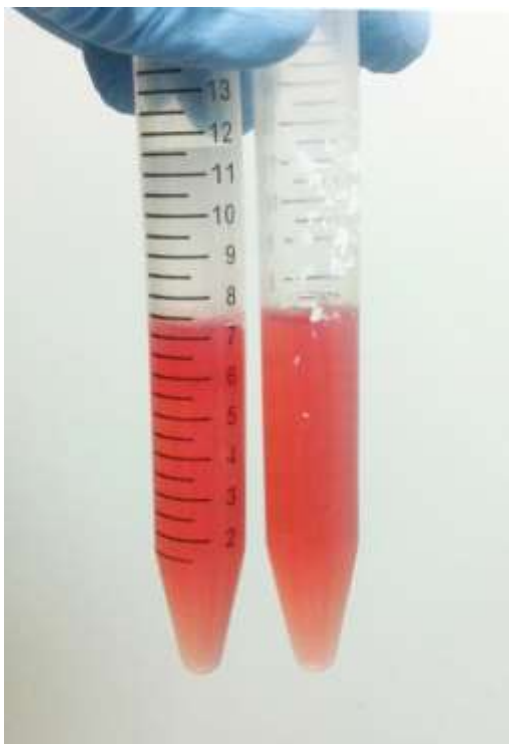


Fig. 22 – Neutrófilos sendo contados numa superfície de titânio, na calibração do número de neutrófilos ideais, força de centrifugação e tempo, para teste de adesão. MEV com aumento de 400 x.



Figs. 23 e 24 - A zona de neutrófilos é recolhida a 2 tubos Falcon e, após lavagem do Percoll e centrifugação, consegue-se chegar ao número desejado de neutrófilos por microlitro.

❖ Células:

Neutrófilos foram separados de sangue total humano (Figs. 23 e 24), em todos os experimentos foi conseguido um número de neutrófilos maior que 10^6 com viabilidade média de 92,8%, sendo a melhor proporção a de 96,7% e a pior de 87,3% , e a concentração foi otimizada para se ter 6.667 neutrófilos por μL (Fig. 24), ou seja, em 30 μL aplicamos 200.010 neutrófilos por disco.

❖ NBT lâmina:

Os testes de *nitroazul de tetrazolium* mostraram-se eficientes na análise tanto de neutrófilos quiescentes quanto de ativados (Prancha 1). Com o Nitroazul apresentando o precipitado de Formazan, a contagem foi feita por visualização direta de grânulos com coloração azulada ou enegrecida consequente à redução do NBT, intra-citoplasmática ao microscópio óptico. A redução do NBT pode ser utilizada como marcador de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos. O NBT é um corante com baixo potencial redutor, mas que produz um produto intensamente corado quando reduzido, o

Formazan. O NBT é facilmente captado pelos neutrófilos e é reduzido no interior da célula. (NEVES, A.C.D., 2010) (DA ROSA, E.L.S., 2012) .

Os resultados denotam uma maior produção de EROs pelos discos de titânio, quando comparados aos de zircônia (Prancha 1).

A microscopia óptica ou de luz tem sido utilizada em vários experimentos para análise de tecidos e células, em imunologia e inflamação. Os PMN neutrófilos podem ser analisados por M.O. para a contagem ou em ensaios de viabilidade celular, quimiotaxia e quimioquinesa, polaridade, locomoção, ativação, polarização e migração (DA ROSA, E.L.S., 2012).

Em nossos experimentos obtivemos índice de pureza de até 97,64% (Fig. 25 e 26) e viabilidade celular média acima de 95% (Figs. 27 e 28).

❖ NBT colorimétrico:

Os exames por espectrofotometria revelaram uma média de maior produção de EROs pelos discos de titânio, seguida pelos de zircônia, esses pelos de zircônia sinterizada e o disco controle com menor produção de EROs.

Segundo Virella (2007), em estudos com neutrófilos, o pico de absorvância do NBT reduzido se dá no comprimento de onda de 515 nm. Por isso escolhemos esse parâmetro para a análise da espectrofotometria de nossos experimentos.

A espectrofotometria detectou a produção de Espécies Reativas de Oxigênio, pelo aparelho SoftMax Pro 6.3 gerando gráficos tanto de cada condição testada, bem como da comparação entre elas e o controle (Pranchas 2, 3 ; Figs. 29, 30 e 31 e Tabelas 5 a 12).

Os gráficos da espectrofotometria mostra ativação das condições testadas, quando comparadas à condição controle (Prancha 2), pela produção de Espécies Reativas de Oxigênio.

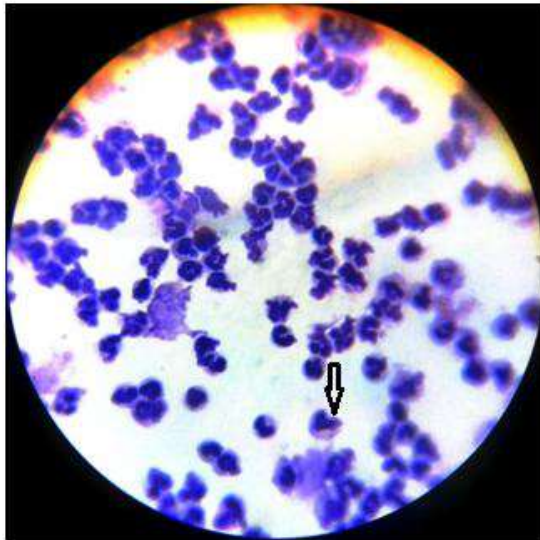


Fig. 25 - Teste de Pureza do experimento, evidenciando alta porcentagem de Neutrófilos na coloração Panóptico a 1.000 X de aumento. (Notar 1 eosinófilo contaminante. Seta). Nesse campo, foram contadas 127 células, das quais 3 não são neutrófilos, o que dá 2,36 % de contaminantes.

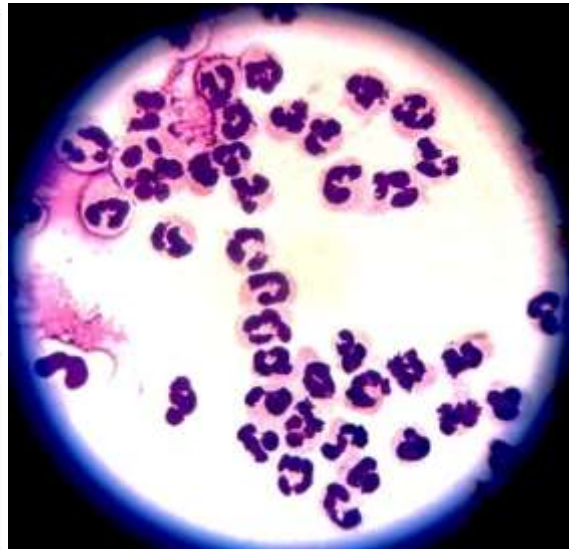


Fig. 26 - Lâmina do paciente MPOR140916 mostrando 40 células, todas neutrófilos.

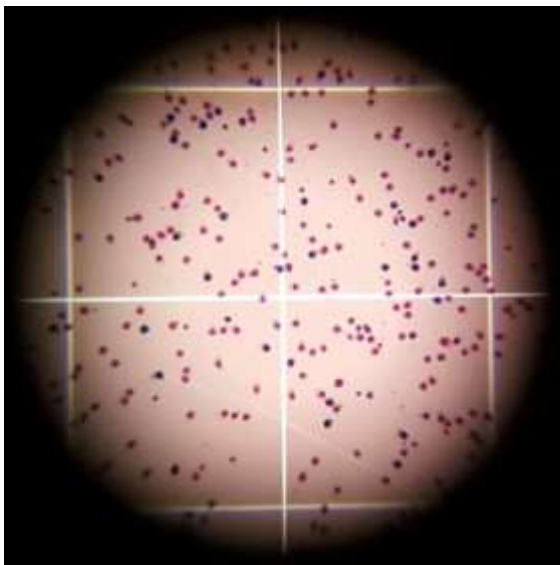


Fig. 27 - Com 40 x de aumento.

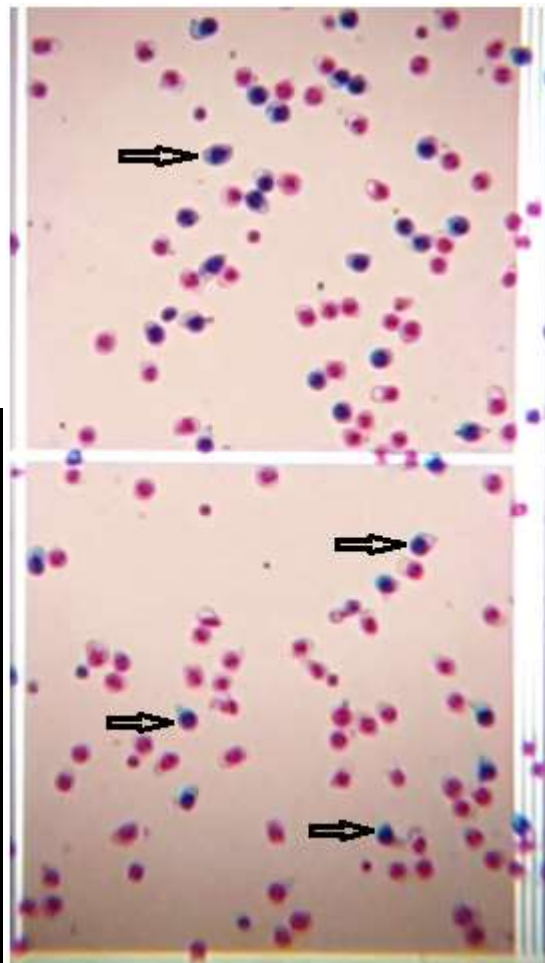
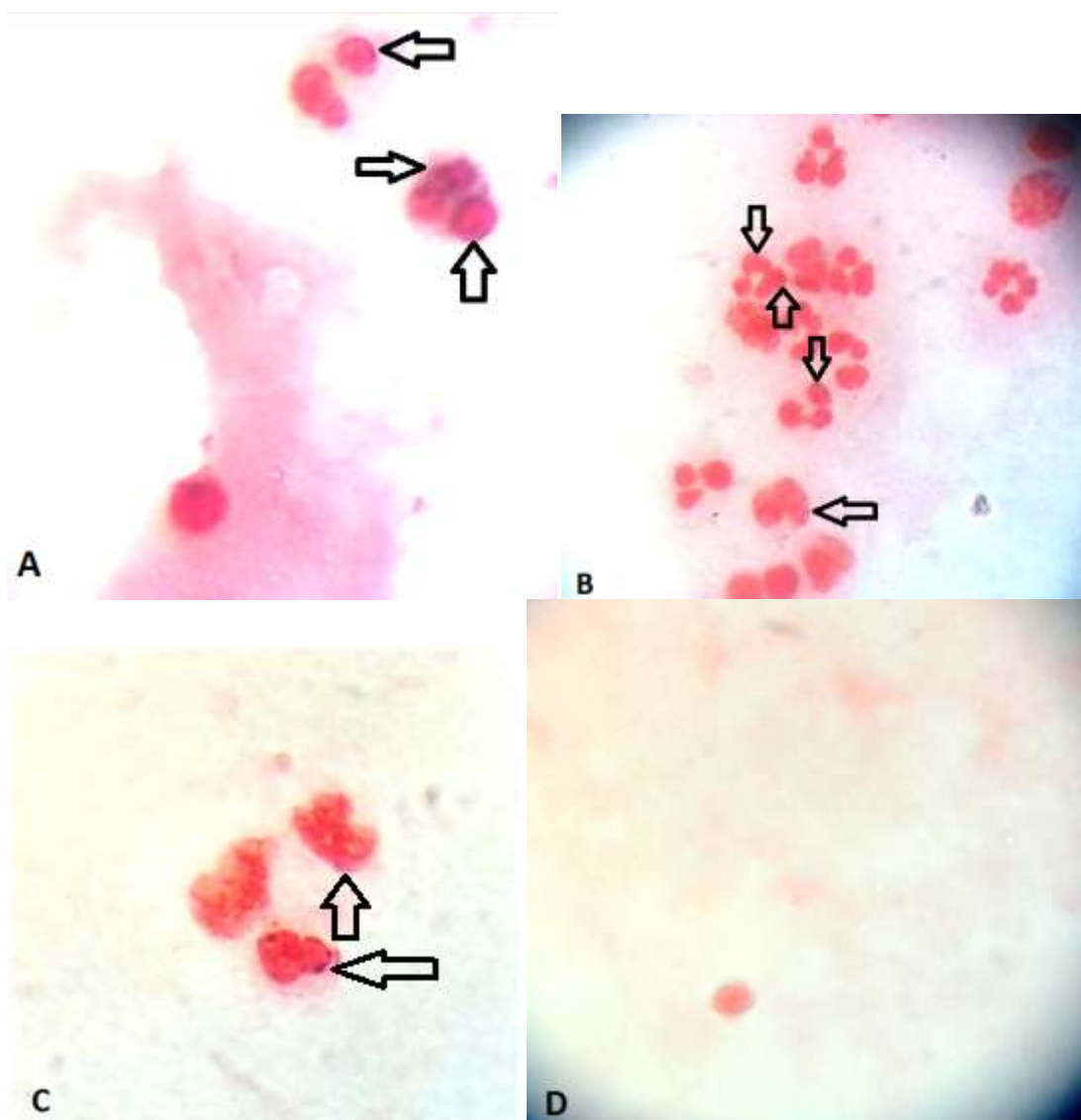


Fig. 28 - Com aumento de 100 x Contagem na Câmara de Neubauer . Em maior aumento células inviáveis aparecem escuras (setas).

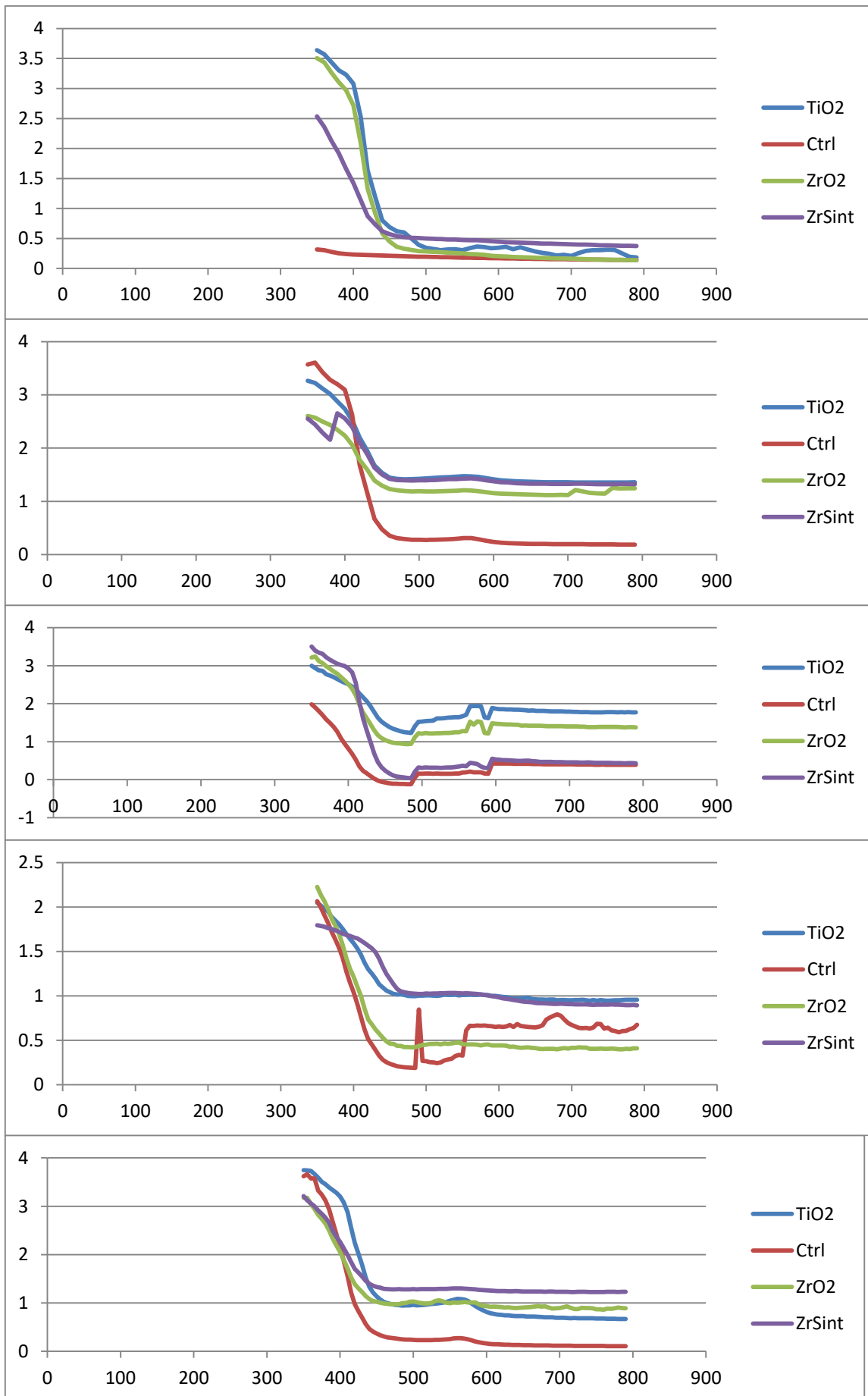


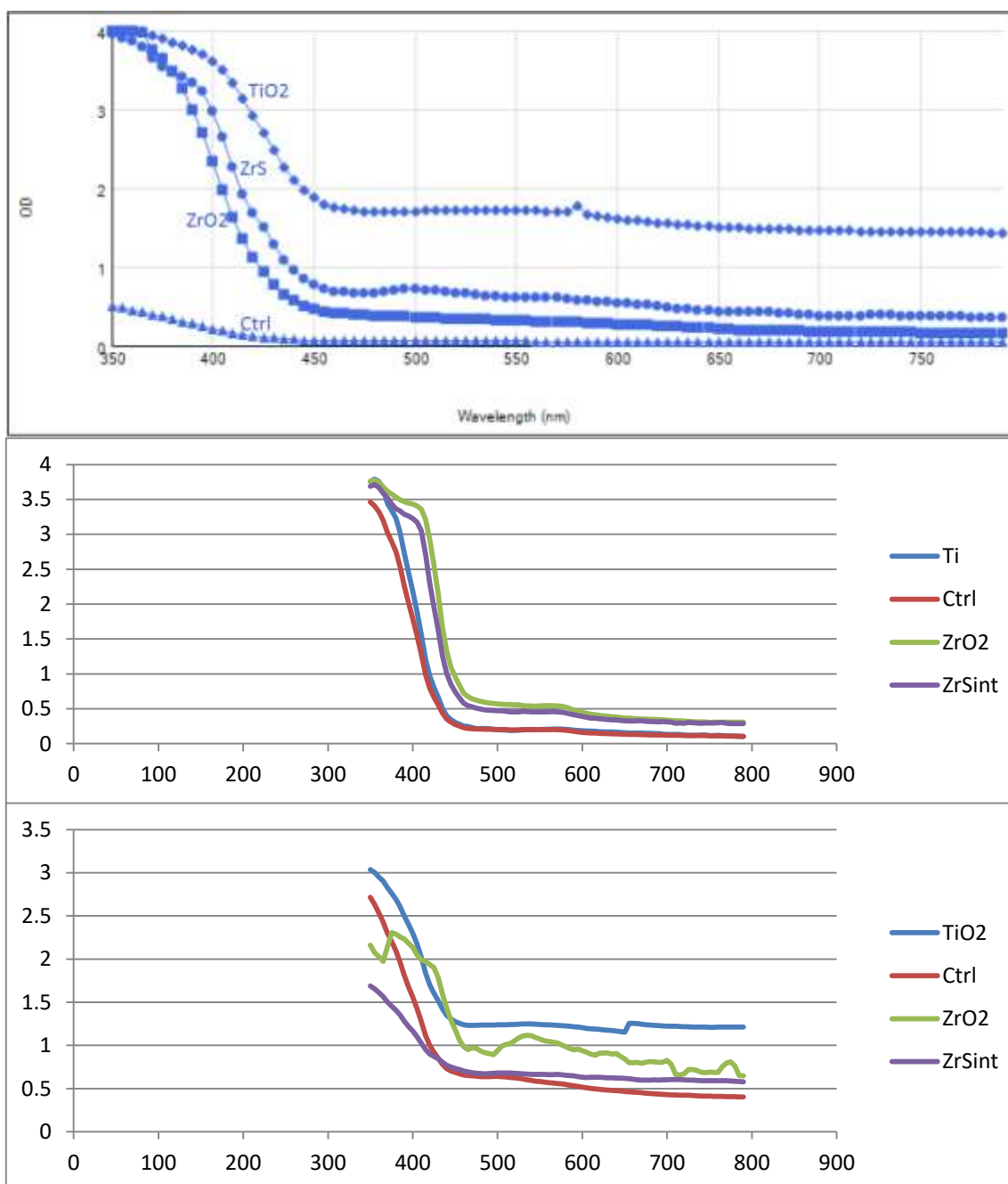
Prancha 1 - A - Neutrófilos ativados por Titânio (doador DDG-230117). Notar os grânulos Azurófilos nos núcleos em pontos circundantes.

B - Neutrófilos ativados por Zircônia Sinterizada (doador DDG-230117). Notar grânulos de Formazan em pontos e pequenos grumos junto aos núcleos. C – Neutrófilos ativados por Zircônia comum do doador SCBJ130117. Notar os grânulos de Formazan ao redor das células.

D - Neutrófilos (raros) do grupo Controle do doador COGS300117, praticamente sem grânulos de Formazan.

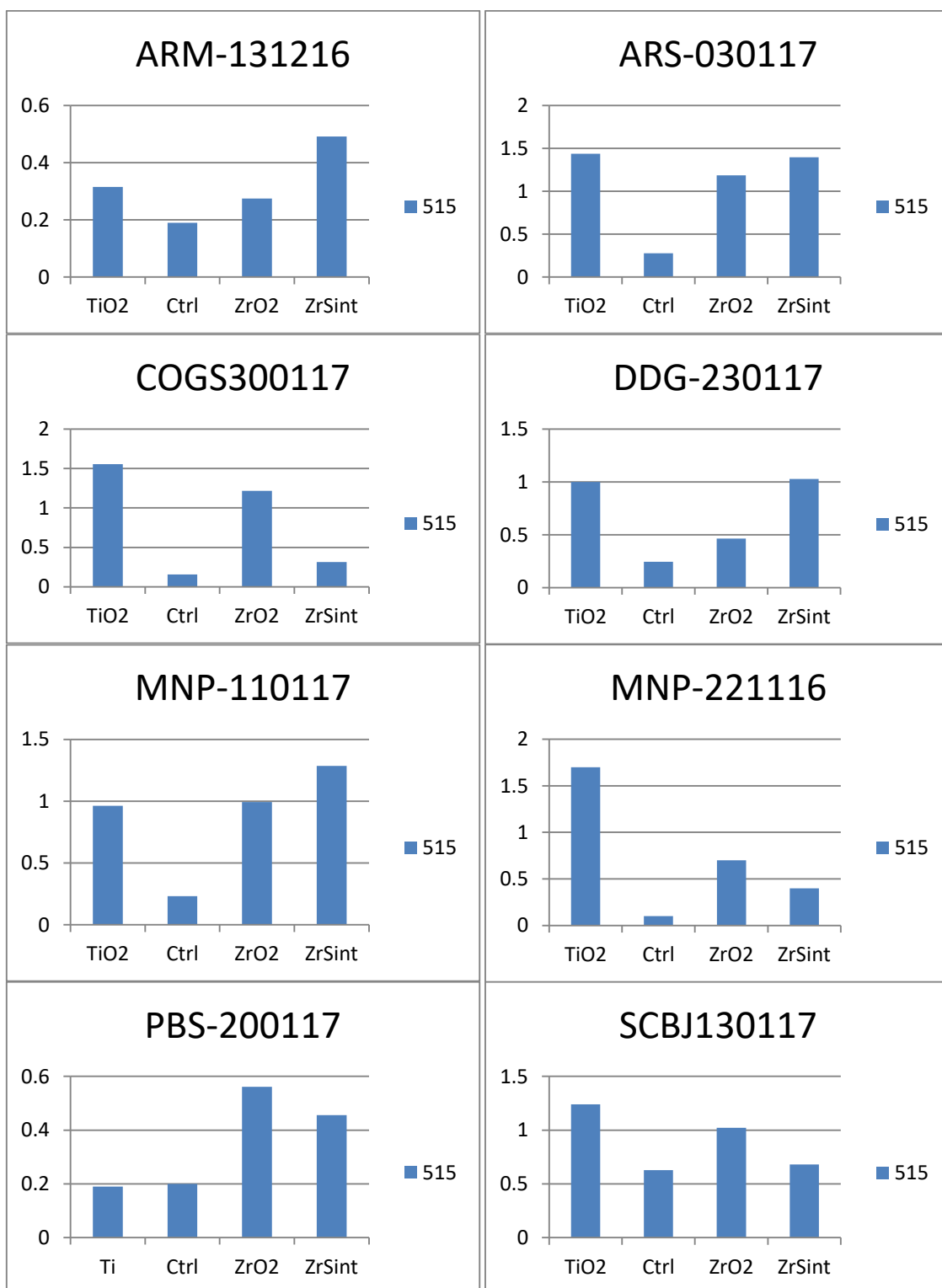
Todos examinados ao microscópio óptico com óleo de imersão no aumento de 1.000 x.





Prancha 2- Todos os gráficos produzidos por espectrofotômetro, medindo absorvância por comprimento de onda (em nm). Aparecem as 4 condições testadas.

Os gráficos de Absorvância no comprimento de onda de 515 nm mostraram diferença estatisticamente significativa entre a condição controle e as condições testadas (Prancha 3 ; Figuras 29 e 30 ; Tabelas 5, 8 e 9)



Prancha 3 - Todos os pacientes (n) com as 4 amostras medidas quanto ao grau de Absorbância no comprimento de onda de 515 nm, considerado por Virella (2007) como o pico de absorbância do NBT reduzido com relação a neutrófilos.

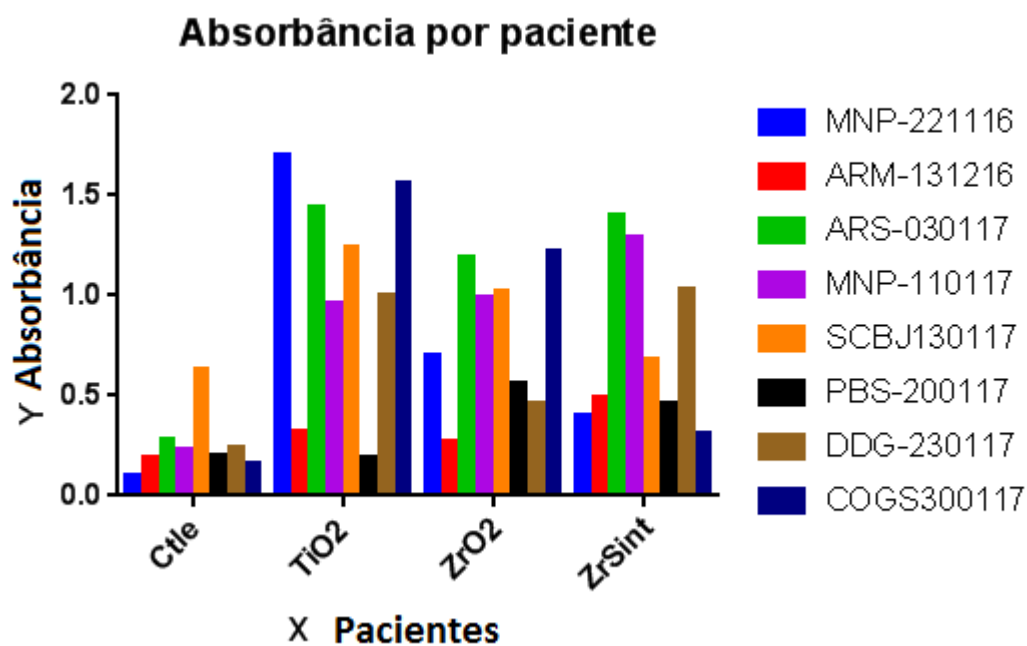


Fig. 29 – Gráfico mostrando o grau de absorvância pelos 8 pacientes (n), agrupados segundo cada uma das 4 condições testadas (Controle, Titânio, Zircônia e Zircônia Sinterizada).

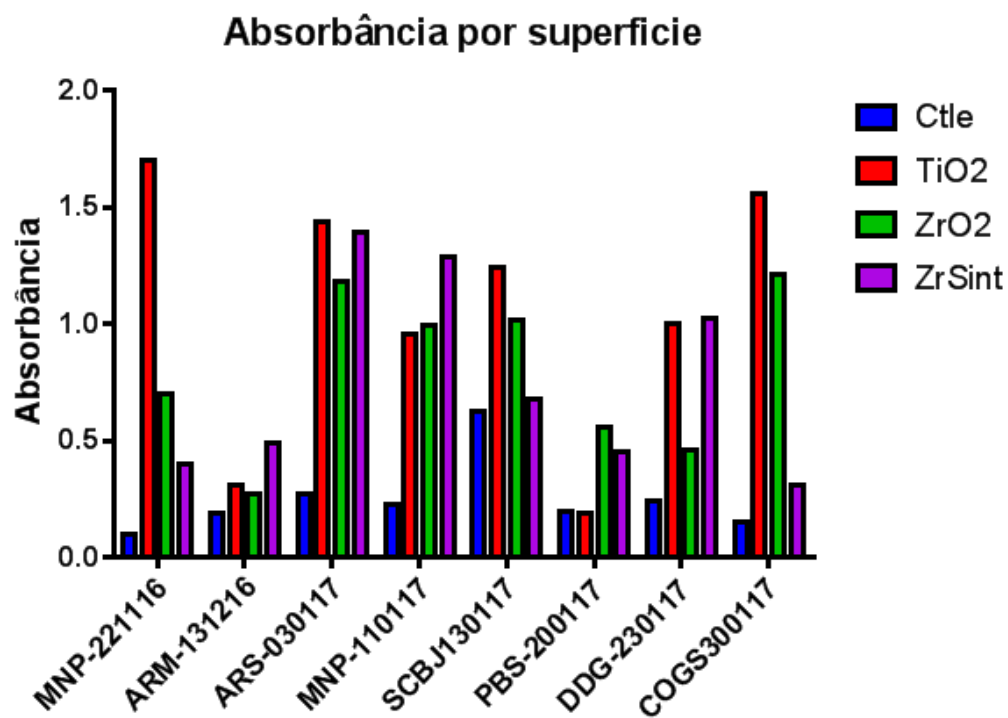


Fig. 30 – Gráfico mostrando Absorbância pelas diversas superfícies testadas (Condições), aqui agrupadas segundo os pacientes (n).

ABSORBÂNCIA MÉDIA em 515 nm			
TiO ₂	Ctrl	ZrO ₂	ZrSint.
1,05025625	0,25358125	0,8023125	0,75664375

Tabela 5 - Valores médios de absorvância para cada uma das 4 condições testadas no pico de absorvância para neutrófilos (515 nm).

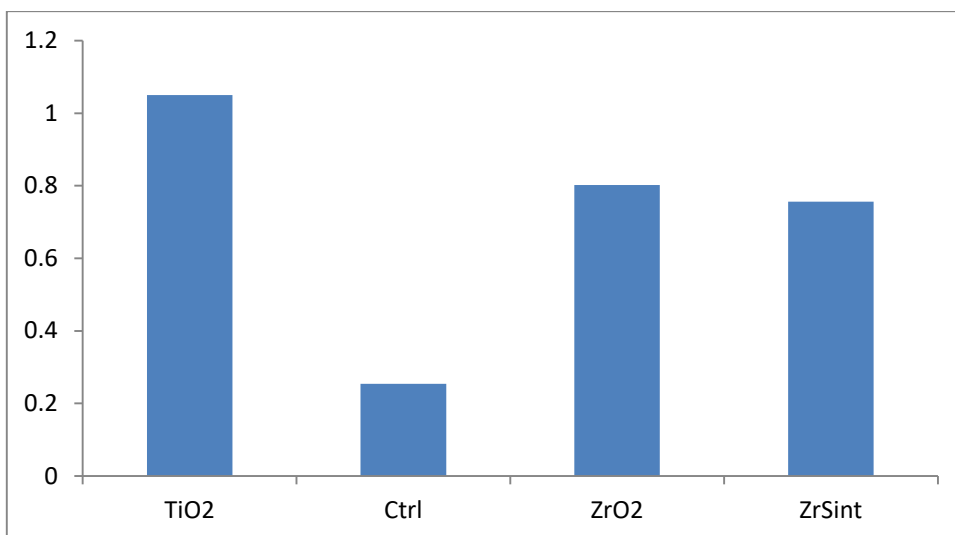


Fig. 31 – Representação gráfica da Tabela anterior mostrando maior produção de EROs (maior ativação dos neutrófilos) pelas superfícies de titânio, seguido pelas de zircônia, e depois, pelas de zircônia sinterizada. Com menor produção, as de controle.

Absorbância por Superfície		Group A	Group B	Group C	Group D
		Ctle	TiO ₂	ZrO ₂	ZrSint
		Y	Y	Y	Y
1	MNP-221116	0.10000	1.70000	0.70000	0.40000
2	ARM-131216	0.19000	0.31530	0.27495	0.49150
3	ARS-030117	0.27675	1.43745	1.18685	1.39825
4	MNP-110117	0.23100	0.96210	0.99280	1.28620
5	SCBJ130117	0.62850	1.24070	1.02190	0.67960
6	PBS-200117	0.20020	0.18940	0.56130	0.45540
7	DDG-230117	0.24470	1.00020	0.46270	1.02840
8	COGS300117	0.15750	1.55690	1.21800	0.31380

Tabela 6 – Absorbância por Superfície nos 8 pacientes e 4 condições testadas.

As análises mostraram diferença estatística significativa entre o grupo controle e as condições testadas (Fig. 31 e Tabela 5)

Absorbância por Paciente		Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F	Group G	Group H
		MNP-221116	ARM-131216	ARS-030117	MNP-110117	SCBJ130117	PBS-200117	DDG-230117	COGS300117
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Ctle	0.10000	0.19000	0.27675	0.23100	0.62850	0.20020	0.24470	0.15750
2	TiO2	1.70000	0.31530	1.43745	0.96210	1.24070	0.18940	1.00020	1.55690
3	ZrO2	0.70000	0.27495	1.18685	0.99280	1.02190	0.56130	0.46270	1.21800
4	ZrSint	0.40000	0.49150	1.39825	1.28620	0.67960	0.45540	1.02840	0.31380

Tabela 7 - Absorbância por Pacientes nas 4 condições testadas.

Friedman 1way ANOVA		
ANOVA		
1	Table Analyzed	Absorbância por superfície
2		
3	Friedman test	
4	P value	0.0060
5	Exact or approximate P value?	Approximate
6	P value summary	**
7	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
8	Number of groups	4
9	Friedman statistic	12.45
10		
11	Data summary	
12	Number of treatments (columns)	4
13	Number of subjects (rows)	8

Tabela 8 - Absorbância por Superfícies em ANOVA, Teste de Friedman mostrando médias significativamente diferentes ($p=0,0060$).

Friedman 1way ANOVA						
Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	3				
3	Alpha	0.05				
4						
5	Dunn's multiple comparisons test	Rank sum diff.	Significant?	Summary	A-?	
6						
7	Ctle vs. TiO2	-16	Yes	**	B	TiO2
8	Ctle vs. ZrO2	-13	Yes	*	C	ZrO2
9	Ctle vs. ZrSint	-15	Yes	*	D	ZrSint
10						
11						
12	Test details	Rank sum 1	Rank sum 2	Rank sum diff.	n1	n2
13						
14	Ctle vs. TiO2	9	25	-16	8	8
15	Ctle vs. ZrO2	9	22	-13	8	8
16	Ctle vs. ZrSint	9	24	-15	8	8

Tabela 9 - Teste de Friedman em ANOVA mostrando comparações com o Controle.

1way ANOVA Differences		A	B	C
		Ctle - TiO2	Ctle - ZrO2	Ctle - ZrSint
		Y	Y	Y
1	MNP-221116	-3.000	-2.000	-1.000
2	ARM-131216	-2.000	-1.000	-3.000
3	ARS-030117	-3.000	-1.000	-2.000
4	MNP-110117	-1.000	-2.000	-3.000
5	SCBJ130117	-3.000	-2.000	-1.000
6	PBS-200117	1.000	-2.000	-1.000
7	DDG-230117	-2.000	-1.000	-3.000
8	COGS300117	-3.000	-2.000	-1.000

Tabela 10 - Mostra as diferenças entre as condições e o Controle.

Friedman 1way ANOVA ANOVA		
1	Table Analyzed	Absorbância por paciente
2		
3	Friedman test	
4	P value	0.1423
5	Exact or approximate P value?	Approximate
6	P value summary	ns
7	Are means signif. different? (P < 0.05)	No
8	Number of groups	8
9	Friedman statistic	10.92
10		
11	Data summary	
12	Number of treatments (columns)	8
13	Number of subjects (rows)	4

Tabela 11 - Teste de Friedman com ANOVA

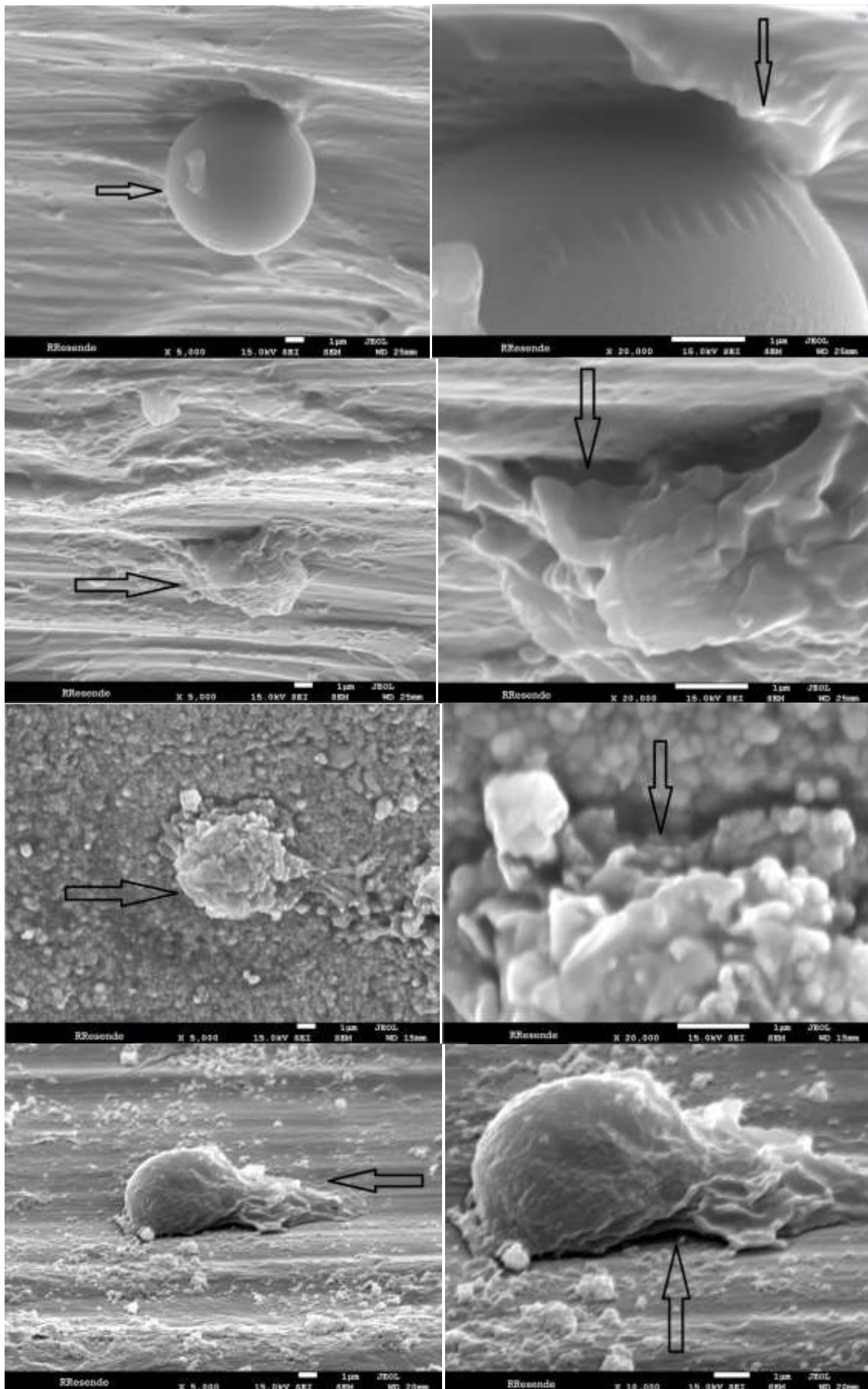
- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Ao exame pelo MEV, não foram encontrados neutrófilos fortemente aderidos sobre os discos Controle.

Células desprendidas dos discos Controle foram examinadas, mas não demonstraram sinais de ativação (Figs. 30, 31 e 32)

Friedman Two-way ANOVA						
Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	28				
3	Alpha	0.05				
4						
5	Dunn's multiple comparisons test	Rank sum diff.	Significant?	Summary		
6						
7	MNP-221116 vs. ARM-131216	5	No	ns		A-B
8	MNP-221116 vs. ARS-030117	-13	No	ns		A-C
9	MNP-221116 vs. MNP-110117	-5	No	ns		A-D
10	MNP-221116 vs. SCBU130117	-9	No	ns		A-E
11	MNP-221116 vs. PBS-200117	4	No	ns		A-F
12	MNP-221116 vs. DDG-230117	-3	No	ns		A-G
13	MNP-221116 vs. COGS300117	-3	No	ns		A-H
14	ARM-131216 vs. ARS-030117	-18	No	ns		B-C
15	ARM-131216 vs. MNP-110117	-10	No	ns		B-D
16	ARM-131216 vs. SCBU130117	-14	No	ns		B-E
17	ARM-131216 vs. PBS-200117	-1	No	ns		B-F
18	ARM-131216 vs. DDG-230117	-8	No	ns		B-G
19	ARM-131216 vs. COGS300117	-8	No	ns		B-H
20	ARS-030117 vs. MNP-110117	8	No	ns		C-D
21	ARS-030117 vs. SCBU130117	4	No	ns		C-E
22	ARS-030117 vs. PBS-200117	17	No	ns		C-F
23	ARS-030117 vs. DDG-230117	10	No	ns		C-G
24	ARS-030117 vs. COGS300117	10	No	ns		C-H
25	MNP-110117 vs. SCBU130117	-4	No	ns		D-E
26	MNP-110117 vs. PBS-200117	9	No	ns		D-F
27	MNP-110117 vs. DDG-230117	2	No	ns		D-G
28	MNP-110117 vs. COGS300117	2	No	ns		D-H
29	SCBU130117 vs. PBS-200117	13	No	ns		E-F
30	SCBU130117 vs. DDG-230117	6	No	ns		E-G
31	SCBU130117 vs. COGS300117	6	No	ns		E-H
32	PBS-200117 vs. DDG-230117	-7	No	ns		F-G
33	PBS-200117 vs. COGS300117	-7	No	ns		F-H
34	DDG-230117 vs. COGS300117	0	No	ns		G-H
35						
36						
37	Test details	Rank sum 1	Rank sum 2	Rank sum diff.	n1	n2
38						
39	MNP-221116 vs. ARM-131216	15	10	5	4	4
40	MNP-221116 vs. ARS-030117	15	28	-13	4	4
41	MNP-221116 vs. MNP-110117	15	20	-5	4	4
42	MNP-221116 vs. SCBU130117	15	24	-9	4	4
43	MNP-221116 vs. PBS-200117	15	11	4	4	4
44	MNP-221116 vs. DDG-230117	15	18	-3	4	4
45	MNP-221116 vs. COGS300117	15	18	-3	4	4
46	ARM-131216 vs. ARS-030117	10	28	-18	4	4
47	ARM-131216 vs. MNP-110117	10	20	-10	4	4
48	ARM-131216 vs. SCBU130117	10	24	-14	4	4
49	ARM-131216 vs. PBS-200117	10	11	-1	4	4
50	ARM-131216 vs. DDG-230117	10	18	-8	4	4
51	ARM-131216 vs. COGS300117	10	18	-8	4	4
52	ARS-030117 vs. MNP-110117	28	20	8	4	4
53	ARS-030117 vs. SCBU130117	28	24	4	4	4
54	ARS-030117 vs. PBS-200117	28	11	17	4	4
55	ARS-030117 vs. DDG-230117	28	18	10	4	4
56	ARS-030117 vs. COGS300117	28	18	10	4	4
57	MNP-110117 vs. SCBU130117	20	24	-4	4	4
58	MNP-110117 vs. PBS-200117	20	11	9	4	4
59	MNP-110117 vs. DDG-230117	20	18	2	4	4
60	MNP-110117 vs. COGS300117	20	18	2	4	4
61	SCBU130117 vs. PBS-200117	24	11	13	4	4
62	SCBU130117 vs. DDG-230117	24	18	6	4	4
63	SCBU130117 vs. COGS300117	24	18	6	4	4
64	PBS-200117 vs. DDG-230117	11	18	-7	4	4
65	PBS-200117 vs. COGS300117	11	18	-7	4	4
66	DDG-230117 vs. COGS300117	18	18	0	4	4

Tabela 12 -
 Dados confrontados, paciente a paciente. Detalhes do teste de comparação múltipla de Dunn.



Prancha 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando células e interações com superfícies.

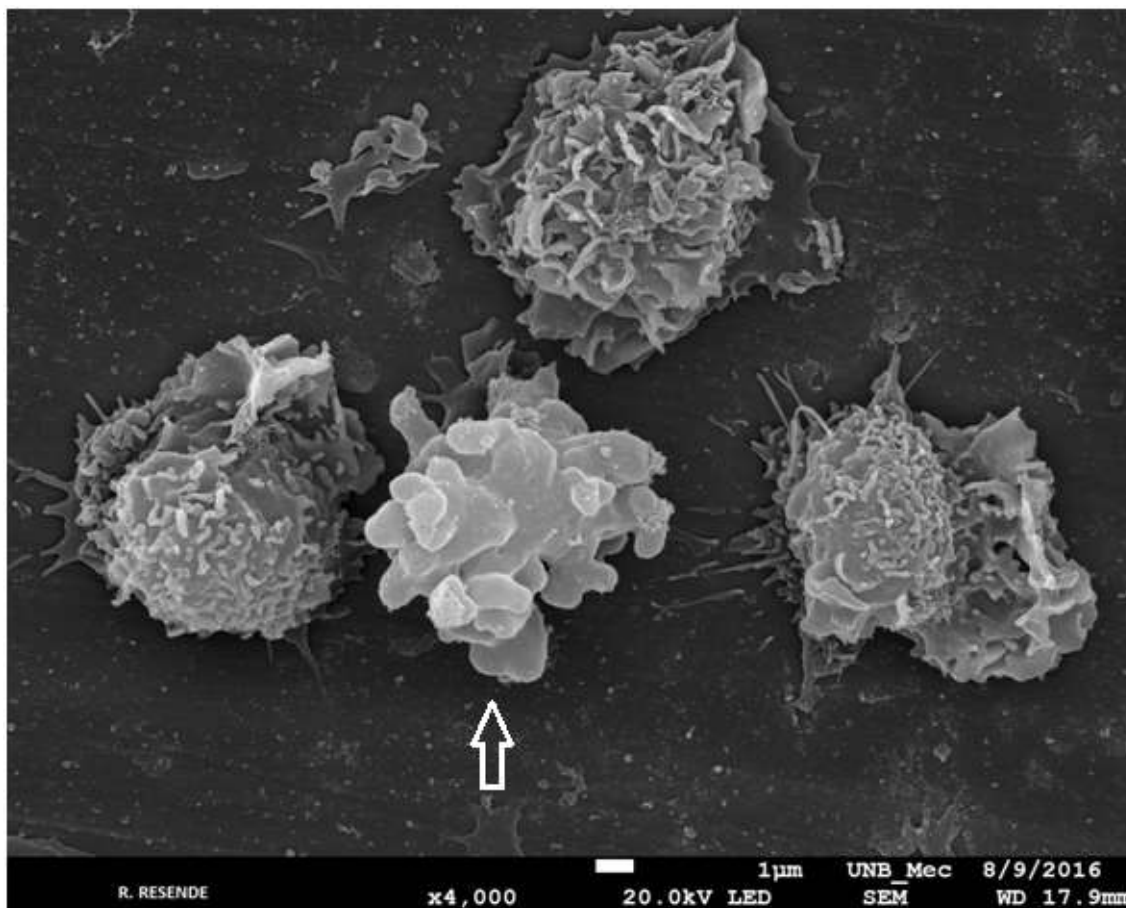


Fig. 32 - Três neutrófilos altamente ativados sobre superfície de titânio, e um (aparentemente mais velho) com forma sugestiva que já está entrando em apoptose (seta). Parece que estão se formando corpos apoptóticos (notar falta de projeções para adesão à superfície), em MEV a 4 mil x de aumento.

A Prancha 4 exibe, de cima para baixo: Linha 1 – Controle: Célula muito arredondada com aspecto sugestivo de Não Ativação (foto da MEV com 5.000x de aumento). Contudo, conseguiu se aderir, em uma reentrância encontrada no disco (foto da MEV com 20.000x de aumento).

Linha 2 – Titânio:

Citoesqueleto bastante modificado denotando ativação (foto da MEV com 5.000x de aumento). Examinando-se a interface célula-superfície, nota-se que o contato é feito por pontos, havendo espaço entre a célula e a superfície (foto da MEV com 20.000x de aumento).

Linha 3 - Zircônia sinterizada:

Uma morfologia celular bem alterada (foto da MEV com 5.000x de aumento), e , igualmente espaços entre a célula e o disco (foto da MEV com 20.000x de aumento).

Linha 4 – Titânio: Aspecto diferente do neutrófilo (foto da MEV com 5.000x de aumento), e como nos anteriores, há grandes espaços sob a célula (foto da MEV com 5.000x de aumento).

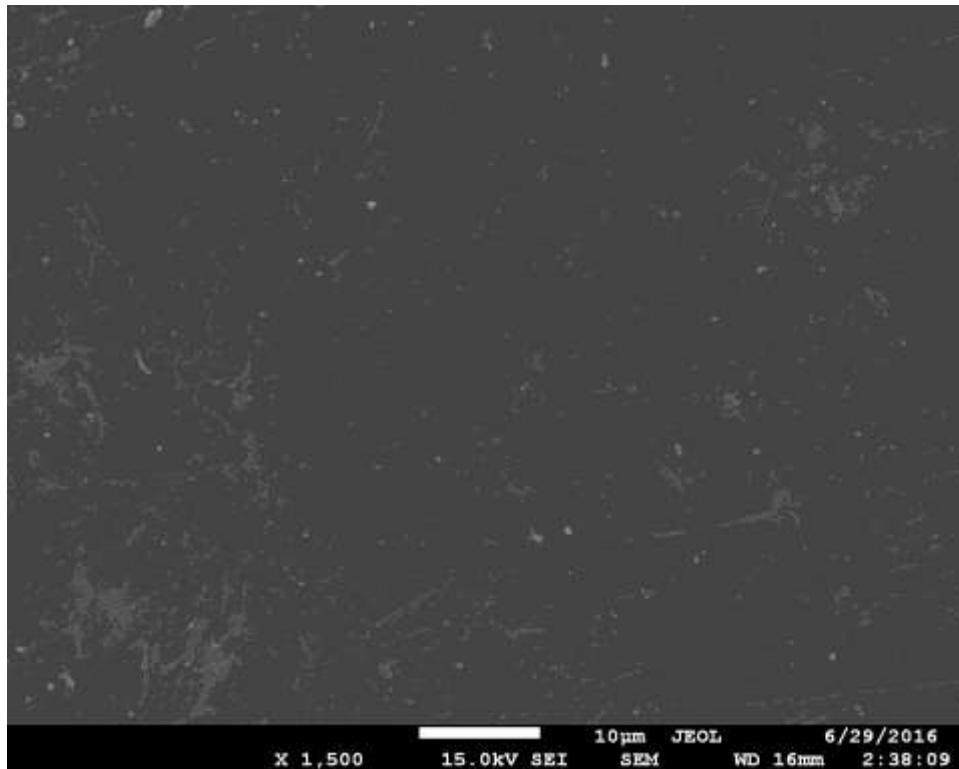


Fig. 33 - Disco controle, sem células aderidas. MEV a 1.500 x de aumento.

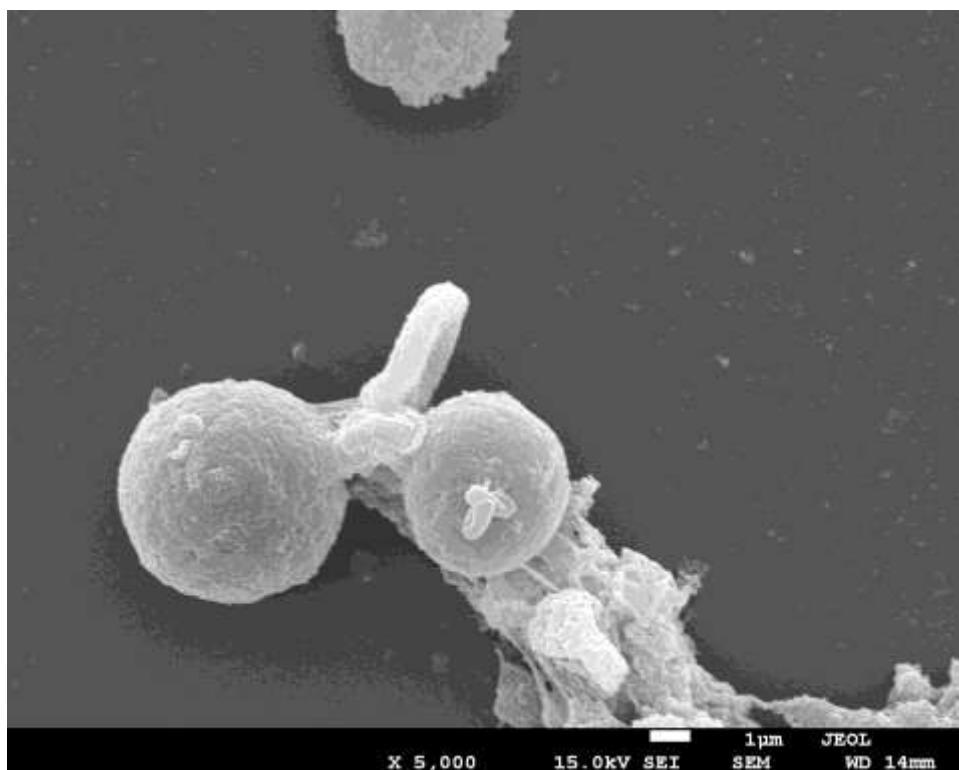


Fig. 34 – MEV com aumento de 5.000x de lâmina com sedimento de centrifugação de experimento com zircônia sinterizada. As células permaneceram bem esféricas sem sinais de ativação.

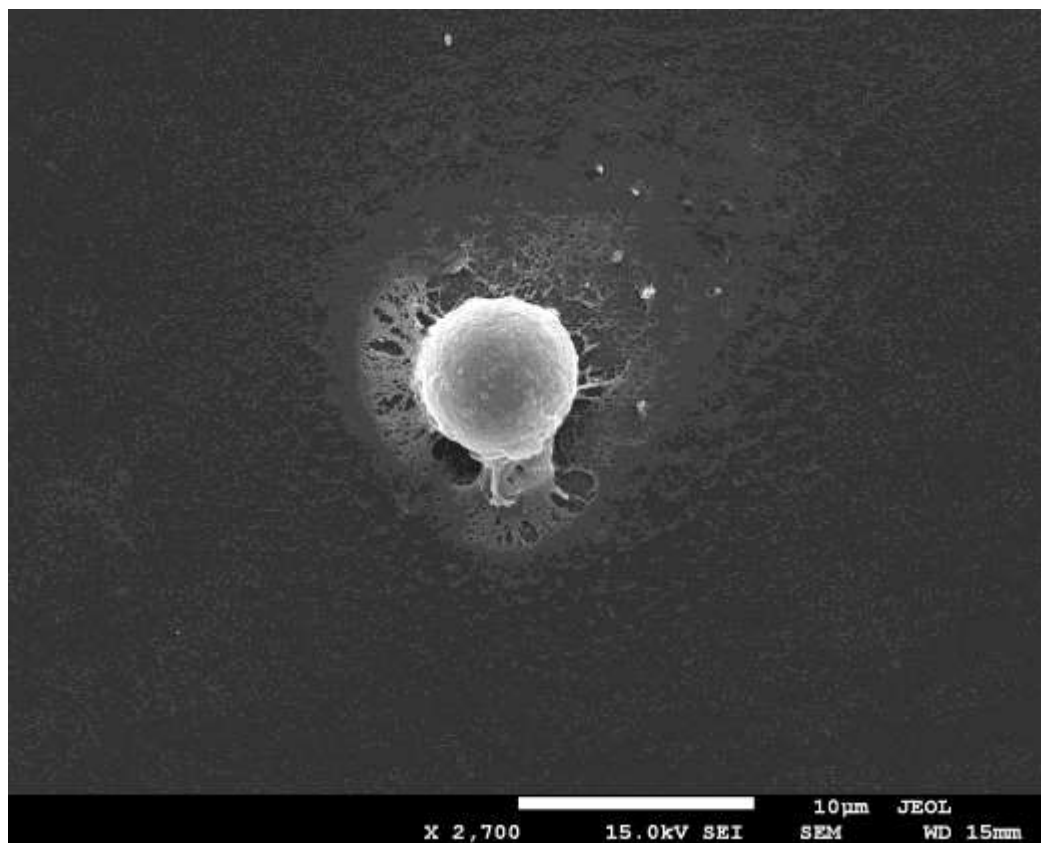


Fig. 35 – MEV com 2.700x de aumento de neutrófilo desprendido de um disco de Controle, após incubação. Pelas características da superfície celular, pode-se evidenciar que não houve ativação.

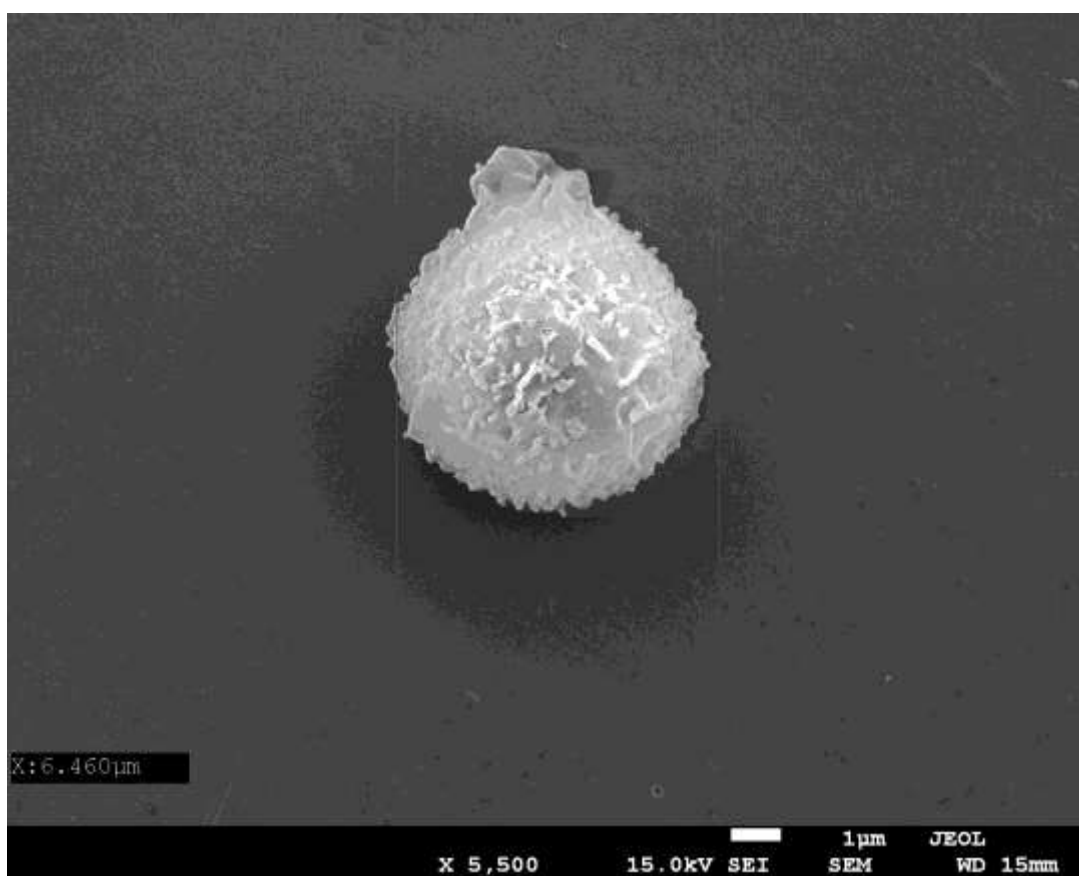


Fig. 36 - MEV com 5.500 vezes de aumento mostrando Neutrófilo desprendido por centrifugação de uma superfície de Zircônia Sinterizada, medindo 6,46 µm de diâmetro.

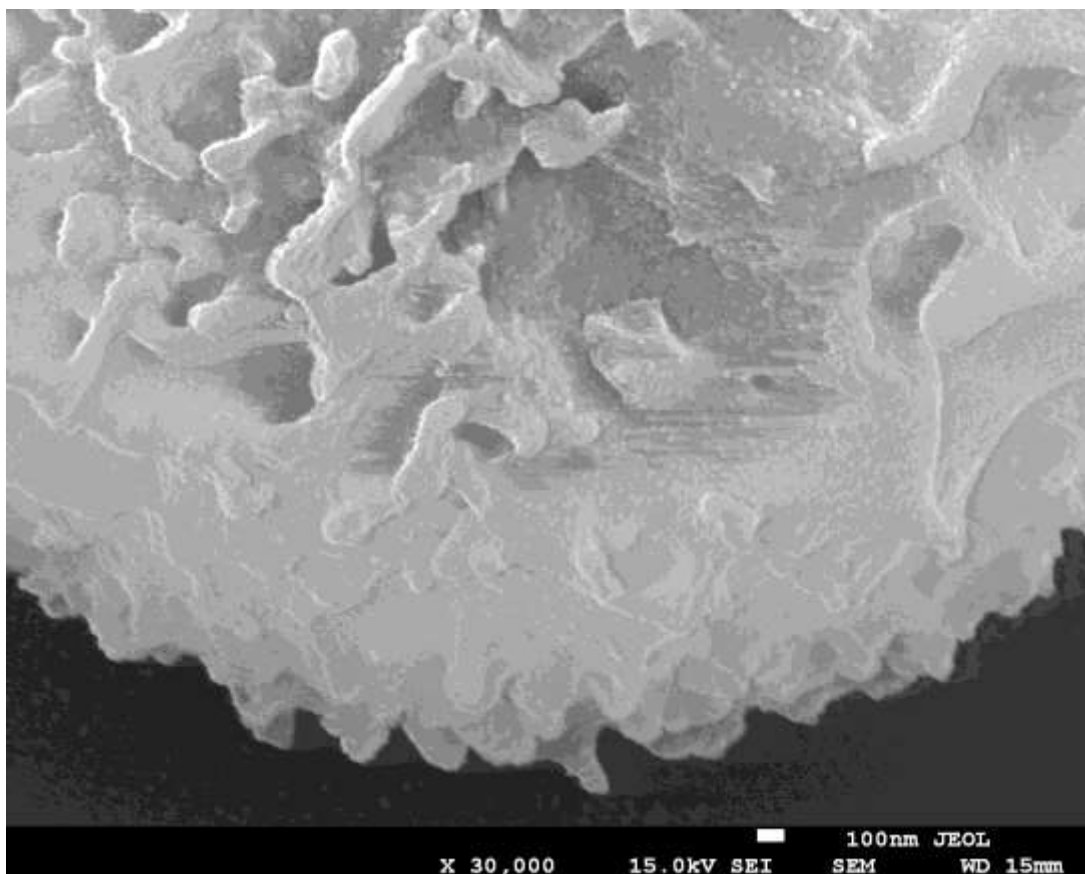


Fig. 37 - Superfície do mesmo neutrófilo com aumento de 30 mil vezes. Nota-se a topografia normal da superfície celular de um neutrófilo, sem sinais de ativação. MEV com 30.000 x de aumento. MEV com 2.000 x de aumento. Como a fig. 21, também com muitas vesículas.

A grande formação de vesículas e NETs nos discos-teste pode ser explicada por alguma falha na manutenção da refrigeração dos neutrófilos, ou mudanças bruscas de temperatura (Figs. 21, 32).

Nos experimentos seguintes, mais bem controlados, o mesmo fenômeno não foi notado. (Prancha 4).

Há indícios que os neutrófilos buscam concavidades para se alojar ou se aderir, conforme podemos ver na Linha 1 da Prancha 4, figuras 48 e 49.

Os discos controle, após a centrifugação não apresentaram células (Fig. 33) ou, quando apresentavam, essas estavam alojadas em alguma irregularidade (linha 1 da Prancha 4)

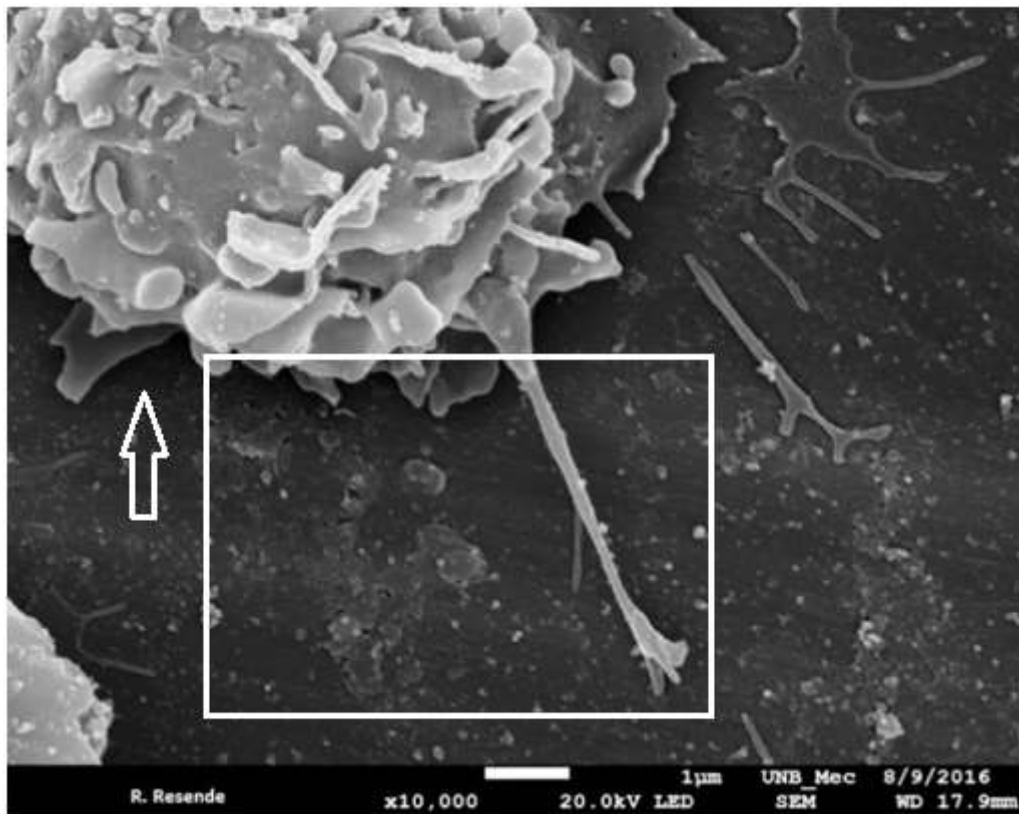
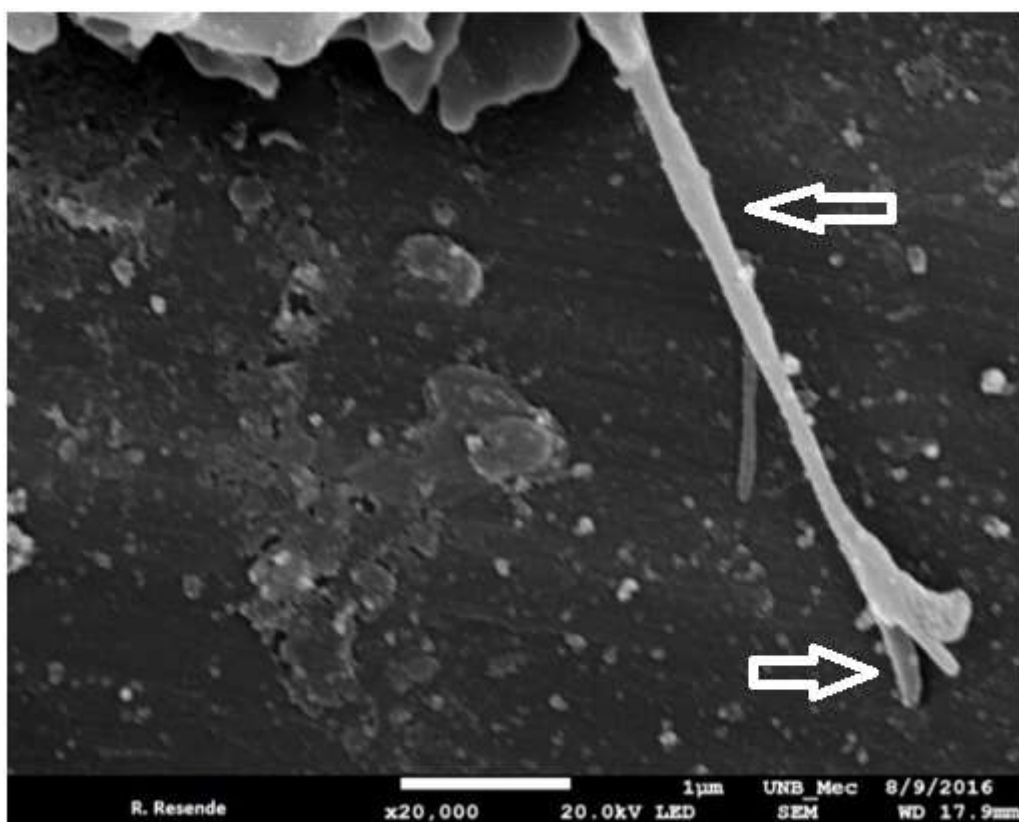


Fig. 38 – Neutrófilo ativado (seta) sobre superfície de titânio. MEV com 10.000 x de aumento



Figs. 39 - Neutrófilos ativados e firmemente aderidos sobre disco de titânio, sob MEV com aumento de 20 mil vezes. Detalhe da projeção túbulo-vesicular de adesão (seta).

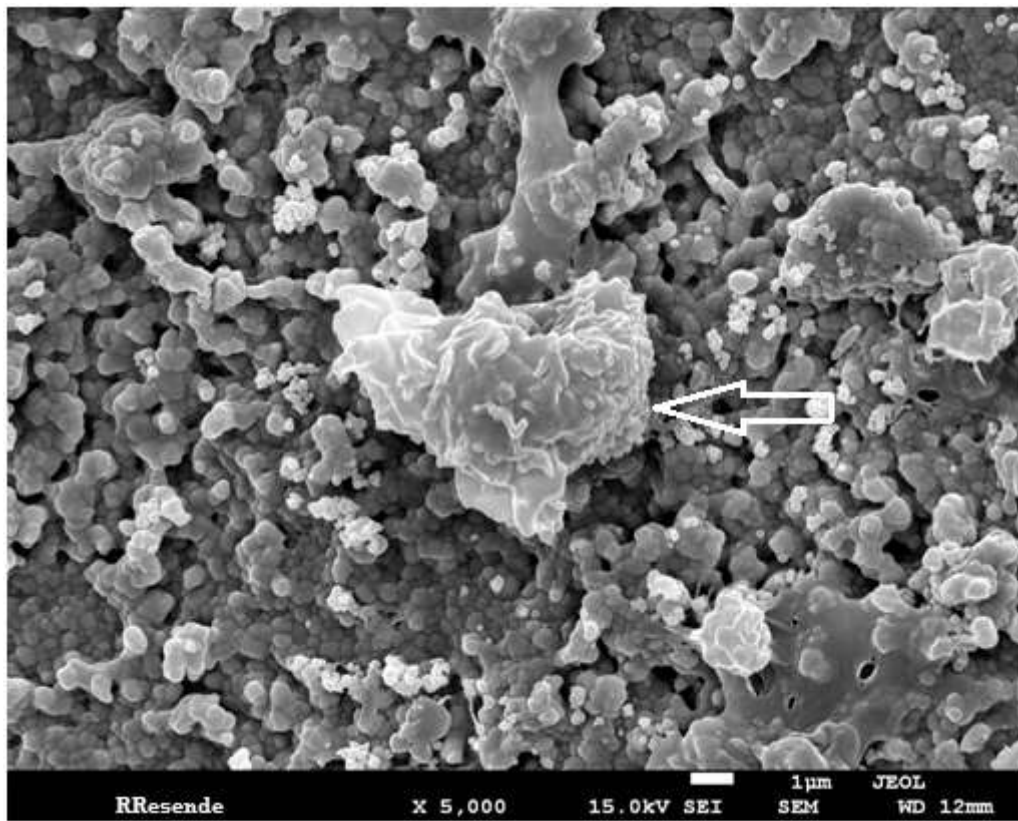


Fig 40 – MEV de 5.000 x de neutrófilo aderido sobre superfície de zircônia sinterizada.

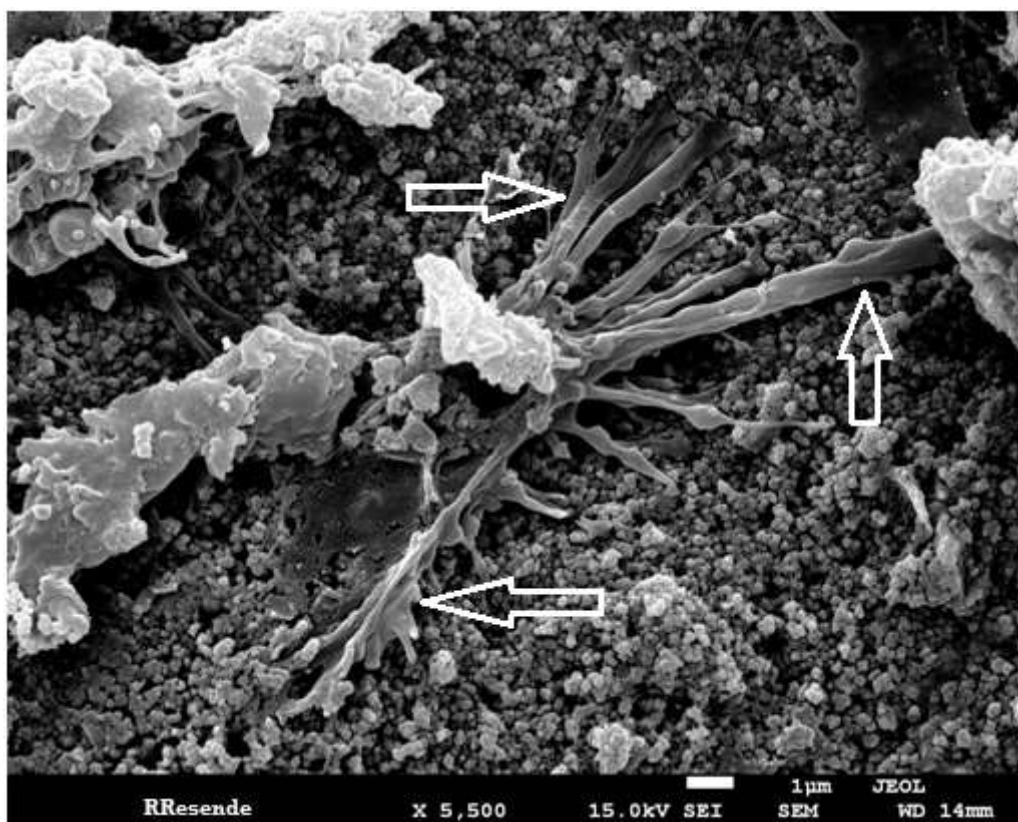


Fig 41 – MEV de 5.500 x de neutrófilo aderido sobre superfície de zircônia normal.
Setas mostram espalhamento e adesão.

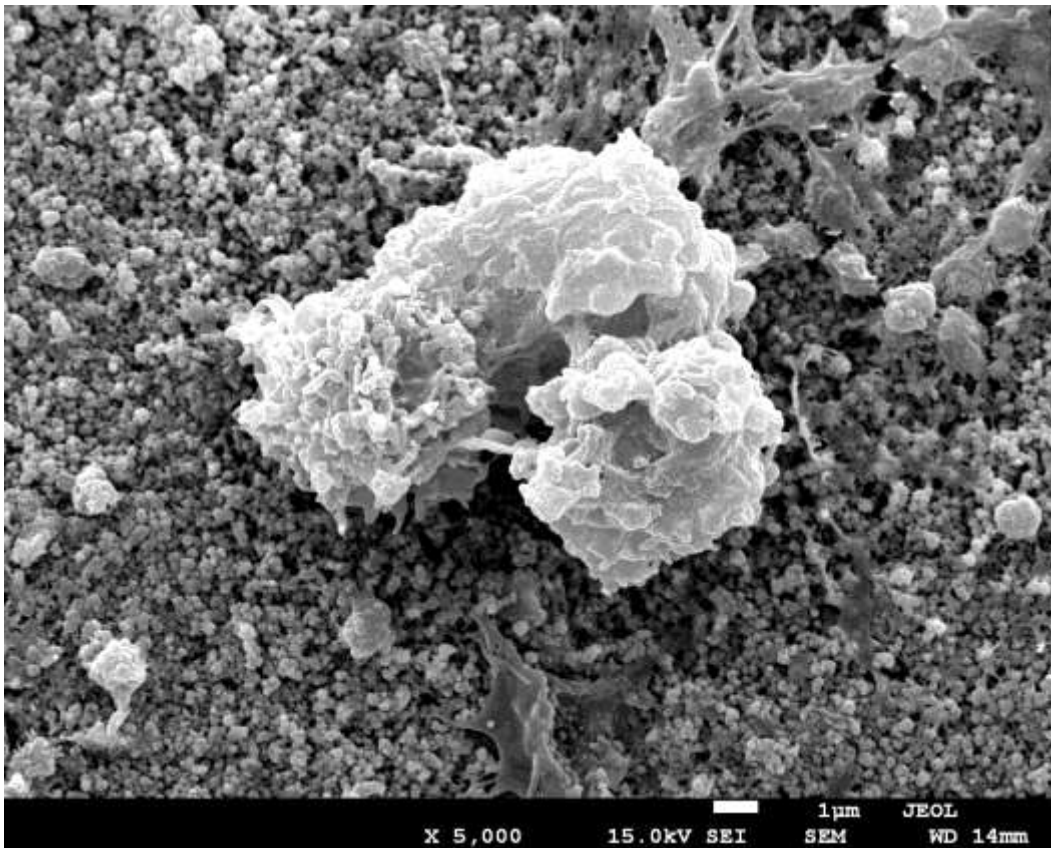


Fig 42 – MEV de 5.000 x de neutrófilo aderido sobre superfície de zircônia normal.

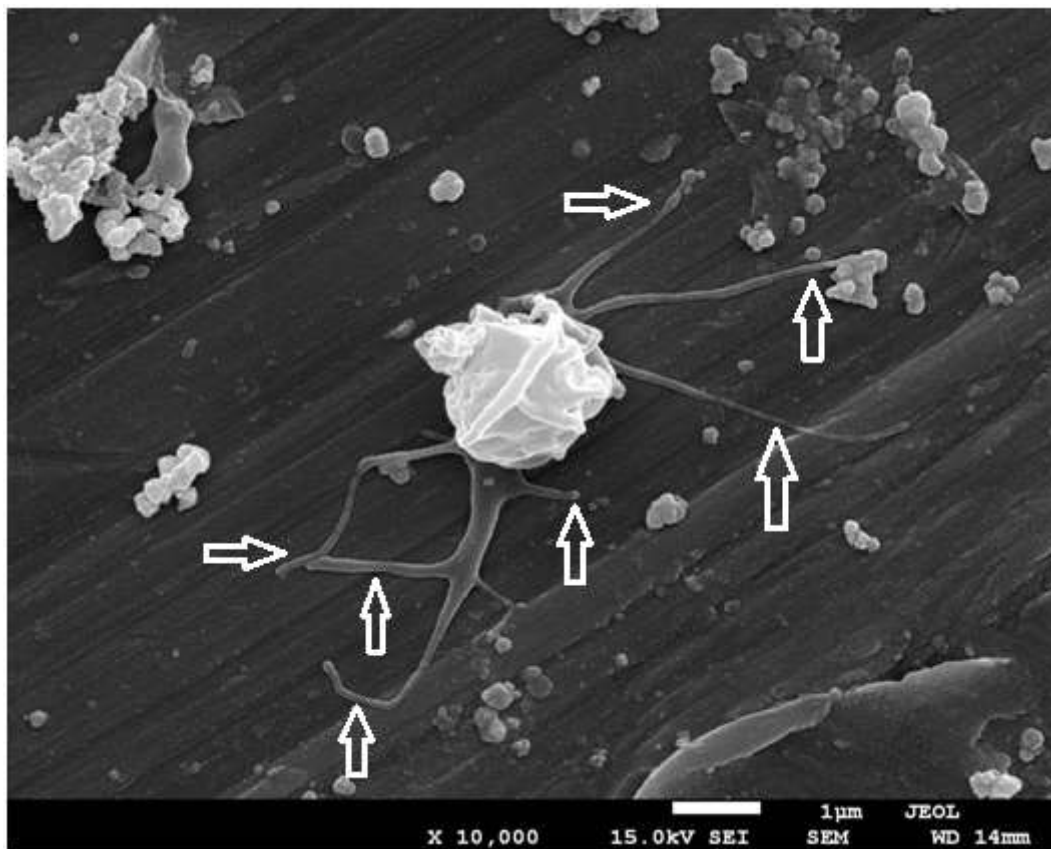


Fig 43 – MEV de 10.000 x de aumento mostrando de neutrófilo aderido sobre superfície de titânio. Setas indicam o espalhamento, um dos sinais de ativação.

Exames à MEV revelaram alta ativação dos neutrófilos sobre os discos de titânio (Prancha 4 e Figs. 43, 44), bem como sobre os de zircônia (Prancha 4 e Fig. 42), com grande modificação do citoesqueleto tanto para o titânio (Figs 38 e 39) quanto para a zircônia (Fig. 40 e 41) e emissão de longas projeções túbulo-vesiculares sobre os discos de titânio (Figs. 43, 44 e 46).

Sobre os discos Controle, raramente encontramos células, uma vez que, mesmo aquelas aderidas não resistiam à força de centrifugação. Já, no sedimento, eram encontrados muitos neutrófilos sem sinais de ativação e hemácias contaminantes (Fig. 34).

No exame de células sobre titânio, zircônia e zircônia sinterizada, fica evidente um padrão de ativação, quando examinamos diversas amostras ao aumento de 5.000 x, sendo que sobre o titânio há uma maior emissão de projeções túbulo-vesiculares (Figs. 44, 46)

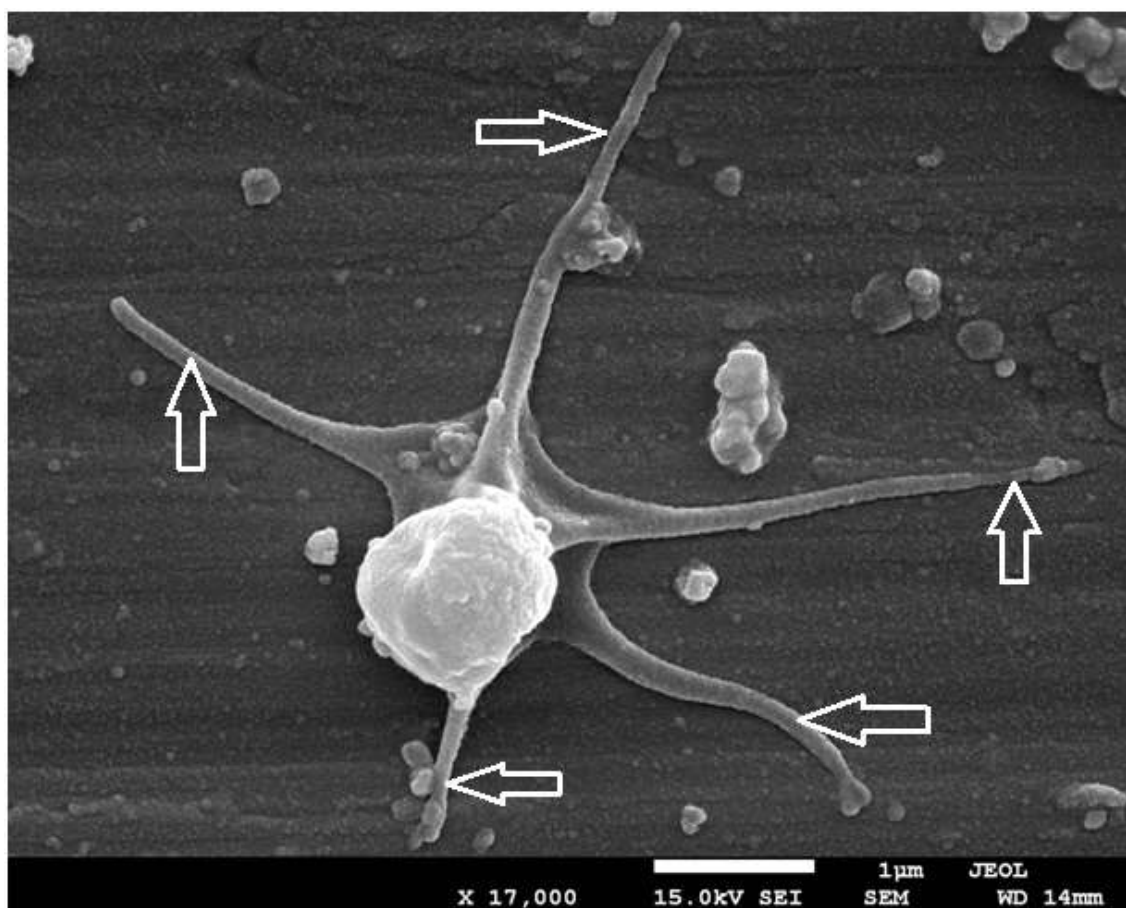


Fig. 44 – MEV de Neutrófilo altamente ativado sobre uma superfície de Titânio, emitindo extensões túbulo-vesiculares (setas). Aumento de 17.000 vezes.

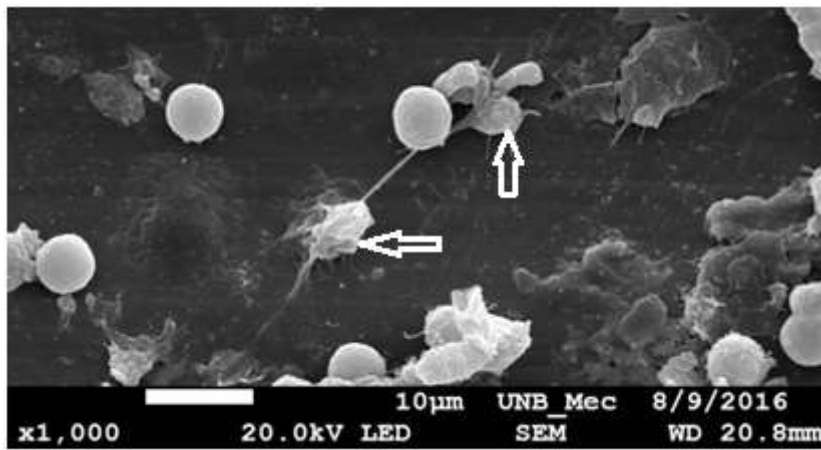


Fig. 45 - MEV de Neutrófilos ativados sobre disco de titânio com 1.000 X de aumento.

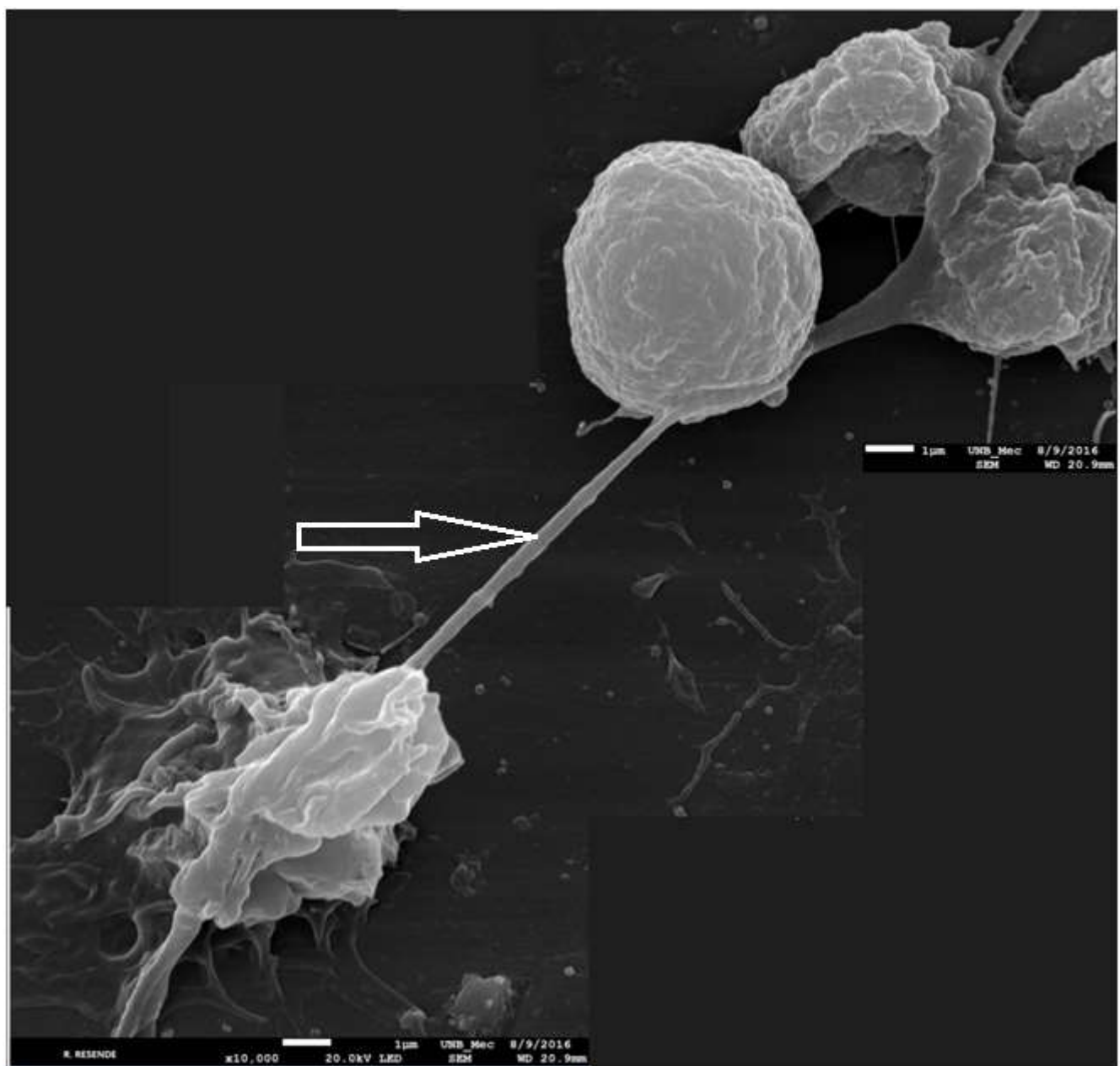


Fig. 46 - Comunicação por extensões túbulo-vesiculares entre neutrófilos ativados (seta em TNT). Combinação de imagens com 10.000 vezes de aumento.

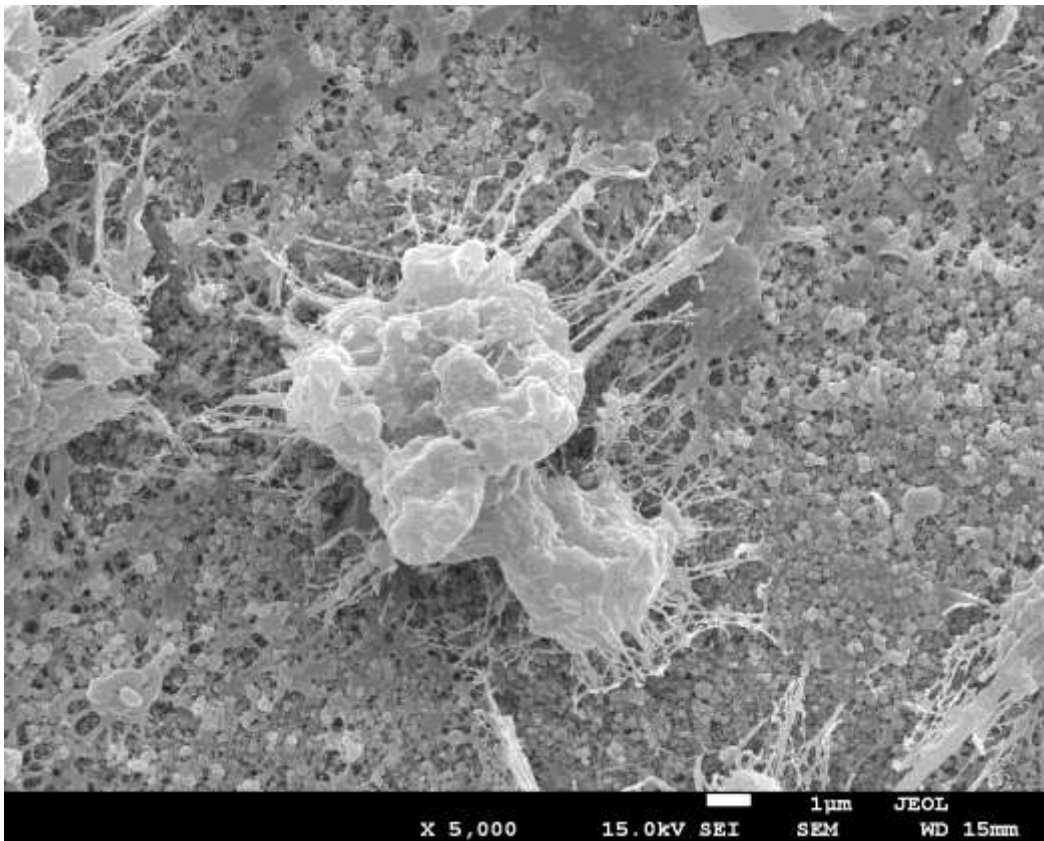


Fig. 47 - Zircônia sinterizada a 5.000 x de aumento com neutrófilo altamente ativado.

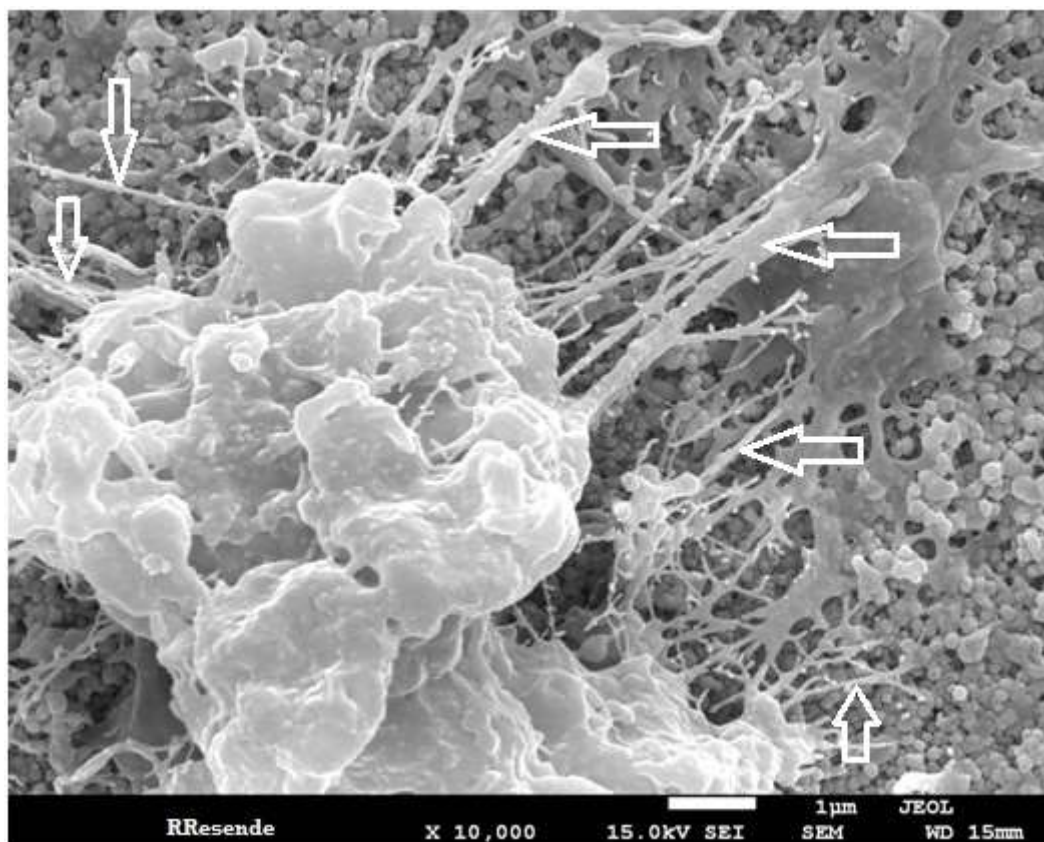


Fig. 48 - Zircônia sinterizada com 10.000 x de aumento mostrando topografia propícia para ancoragem das projeções túbulo-vesiculares de um neutrófilo (setas).

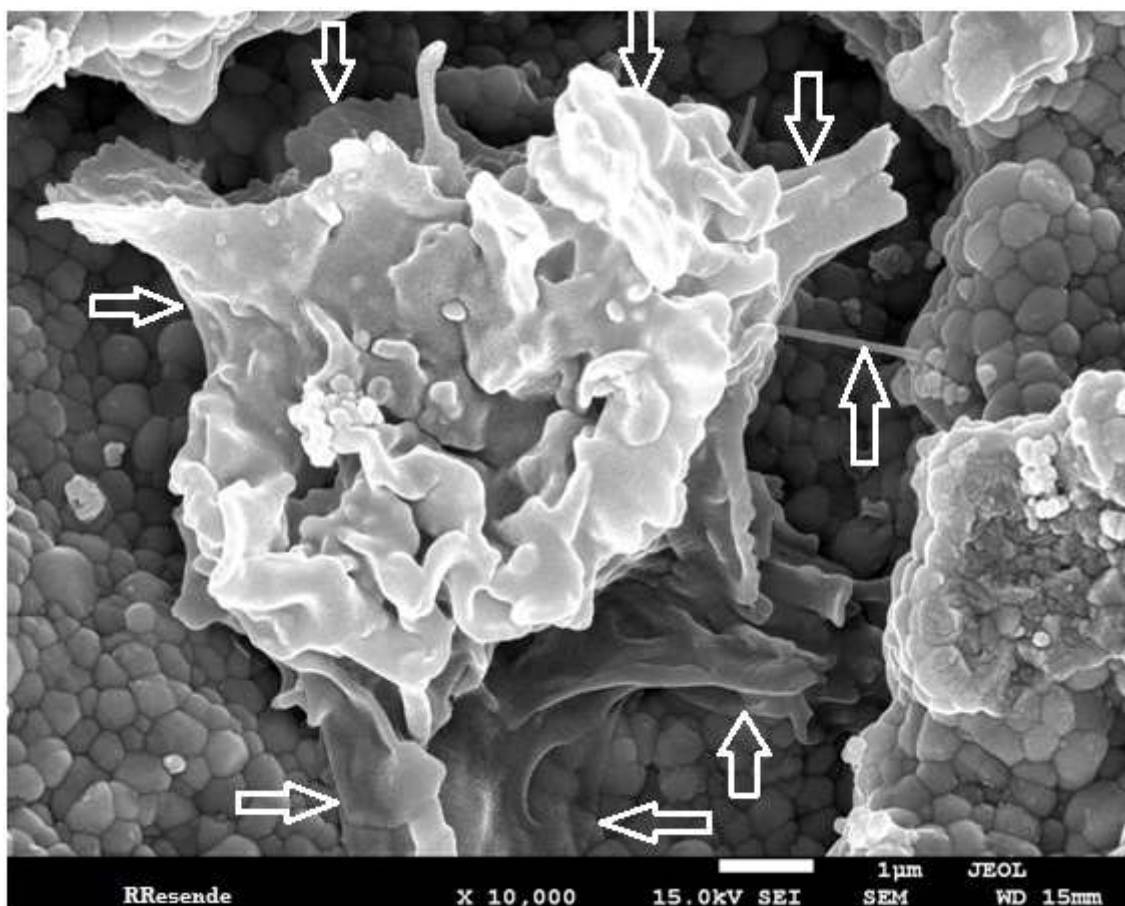


Fig. 49 – MEV de Neutrófilo alojado numa cavidade da superfície de zircônia. Aumento de 10.000 vezes.

Ainda, uma das perguntas no nosso trabalho era o que acontecia no relacionamento da interface entre os neutrófilos e a superfície dos discos. Assim, por não ser possível obter inclinações maiores que 30° no MEV, desenvolvemos suportes (*stubs*) inclinados para conseguirmos observação sob os neutrófilos (figs.16 e 17): Embora os neutrófilos ativados pareçam estar abraçando, se esparramando, ou querendo fagocitar a superfície, o que ocorre, na verdade, são vários pontos de contato entre as células e a superfície:

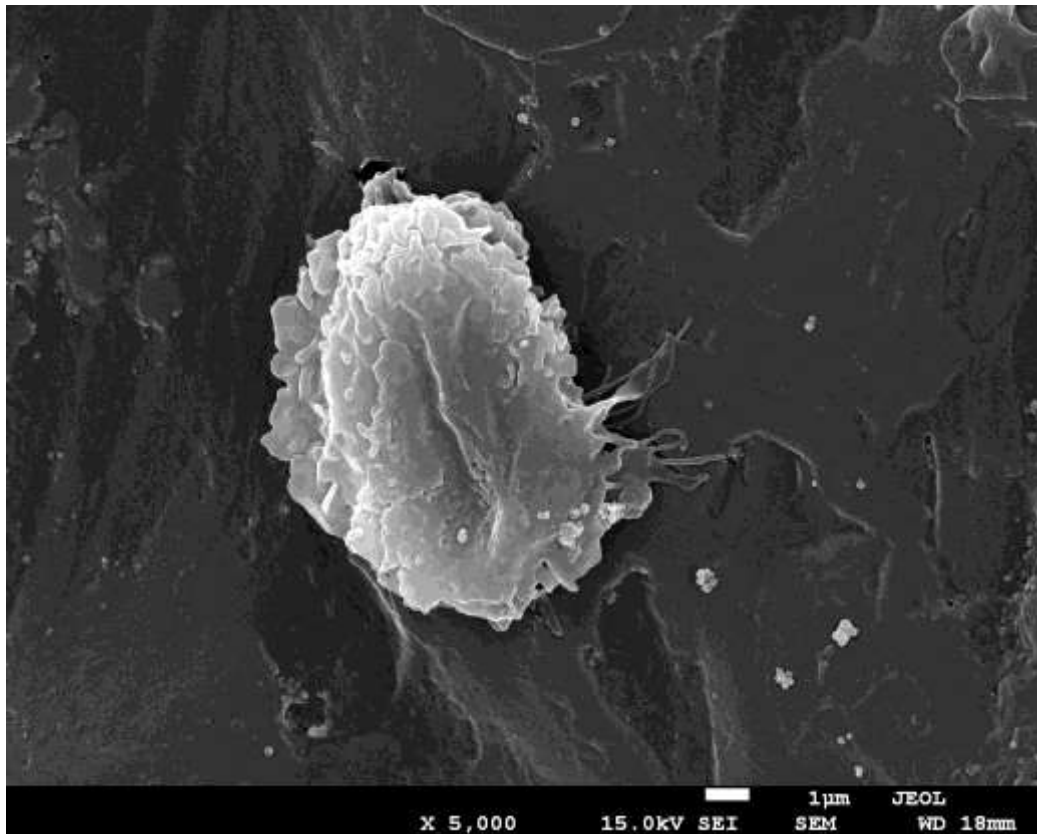


Fig. 50 - Neutrófilo sobre um disco de Titânio, sendo observada a interface em aumento de 5.000 x.

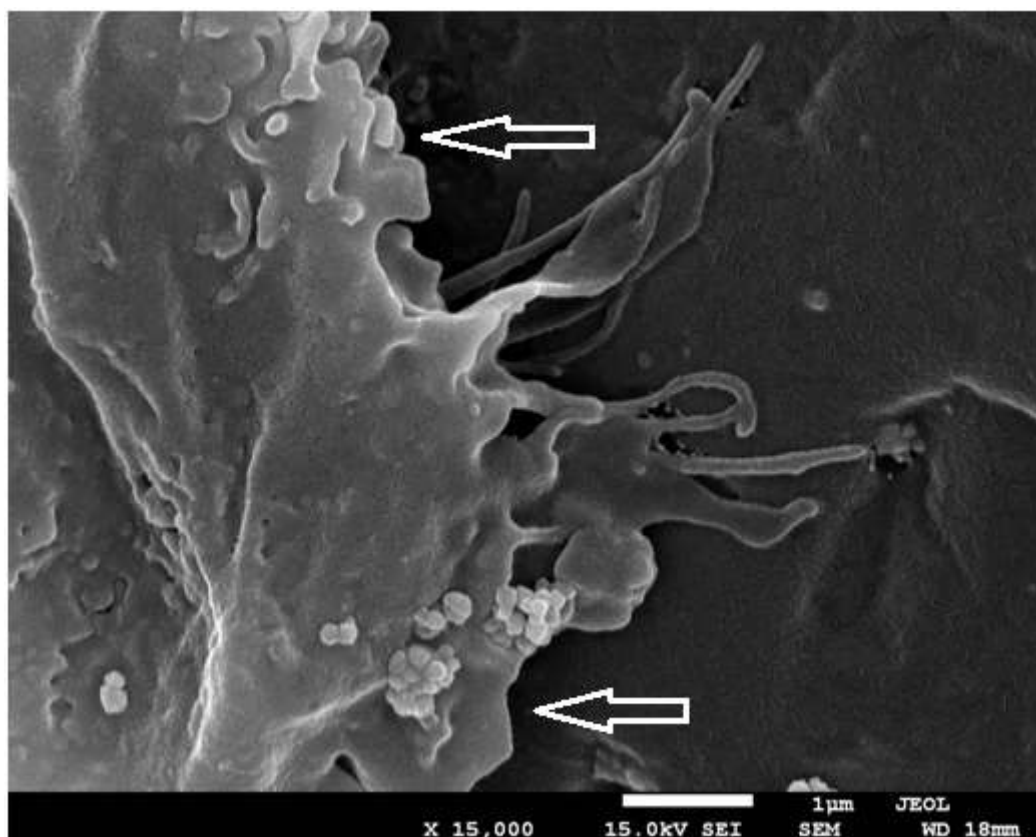


Fig. 51 - Neutrófilo sobre um disco de Titânio, sendo observada a interface em aumento de 15.000 x (notas espaços entre a célula e a superfície – seta).

DISCUSSÃO

Pela literatura revisada, vemos que há concordância que o titânio continua sendo o metal de excelência para implantes dentários, com sucesso comprovado e longa documentação (OSMAN, 2015)(AL-NAWAS, 2015)(ALTUNA, 2016). Isso, em parte, se deve ao fato dele ter um módulo de elasticidade mais próximo ao do osso humano, o que faz distribuir melhor as forças ao longo da interface osso-implante (OSMAN, 2015).

Alguns reconhecem o titânio como padrão ouro para implantes (OSMAN, 2015)(ALTUNA, 2016), não obstante suspeitas de alergia ao titânio (OSMAN, 2015), difusão de íons metálicos nos tecidos circundantes, corrosão, toxicidade nas ligas contendo alumínio e vanádio (KIRMANIDOU, 20016).

Os implantes de zircônia parecem ser promissores. Porém, ainda são necessários mais estudos laboratoriais e clínicos, antes que uma recomendação abrangente possa ser feita (OSMAN, 2015), pois embora os biomateriais cerâmicos sejam hipoalergênicos e menos propensos a causar sensibilidade (SAITO, 2014), a zircônia continua sendo uma cerâmica sujeita a lascas e fraturar, com significantes imperfeições de superfície. Por isso, o uso de implantes de pequeno diâmetro (3,25 mm.) feitos em zircônia deve ser evitado. Por outro lado, estudos apontam a zircônia como substituta do titânio, apresentando osteointegração igual ou semelhante a este, necessitando maior força de torque para remoção do que o titânio (OSMAN, 2015). Justo por essas controvérsias e lacunas, a avaliação da interação de neutrófilos com a zircônia se faz importante.

Os resultados encontrados, quanto à interação de neutrófilos com superfícies de titânio, estão de acordo com os achados de Campos e colaboradores (2014), mostrando que neutrófilos se aderem fortemente à superfície do titânio, o que pode ser observado comparando-se diferentes superfícies de diferentes amostras, sob MEV a 5.000 vezes de aumento. Pôde ser observado que os neutrófilos aderidos sobre superfícies de titânio expressavam mais projeções túbulo-vesiculares, sendo seguidos, em alguns casos, pelos neutrófilos sobre superfícies de zircônia normal. A diferença foi marcante, quando comparados com as superfícies controle.

NBT

Pelo exame das lâminas de NBT foi evidenciada a produção de EROs, sem podermos detectar um padrão de prevalência de qualquer superfície, a não ser das de controle que não mostraram alterações condizentes com ativação, e produzem espécies reativas de oxigênio, e não se aderem nem produzem EROs nos discos controle feitos de polipropileno.

Com relação ao NBT colorimétrico, nossos achados condizem com os de Neves, A.C.D., 2010 e de DA ROSA, E.L.S., 2012. Foram criados gráficos cuja análise estatística apontou significância na diferença entre a espécies reativas de oxigênio geradas pelas amostras em teste e aquelas geradas pelo controle, o que indica que estavam ativados os neutrófilos em contato com titânio, com zircônia comum e sinterizada, e não houve ativação dos neutrófilos sobre os discos controle.

MEV

Quanto aos achados de microscopia eletrônica sobre interação de neutrófilos com as superfícies de zircônia, tanto comum quanto zircônia sinterizada, tudo indica que este seja um trabalho original e pôde tanto comum quanto zircônia sinterizada, tudo indica que este seja um trabalho original e pôde ser demonstrado que seguem um padrão semelhante aos dos neutrófilos sobre titânio, com muitas projeções, formação de vesículas e TNTs, o que demonstra ativação e produção de espécies reativas de oxigênio, o que está de acordo com os resultados encontrados por DA ROSA, E.L.S. (2012) e por Campos e colaboradores (2014).

CONCLUSÕES

Dentro das limitações do presente trabalho e da bibliografia consultada, parece-nos lícito formular as conclusões seguintes:

- ❖ Neutrófilos humanos são ativados por contato com superfícies de titânio, de zircônia e de zircônia sinterizada.
- ❖ Neutrófilos humanos se aderem fortemente e produzem espécies reativas de oxigênio, quando em contato com superfícies de titânio, de zircônia e de zircônia sinterizada.
- ❖ Na interação com titânio e zircônia comum, os neutrófilos produzem mais projeções túbulo-vesiculares que na com zircônia sinterizada.
- ❖ A interação entre células e disco se dá por pontos de contato entre as projeções túbulo-vesiculares dos neutrófilos, mais que por superfícies de contatos ou espalhamento das células.
- ❖ A espectrofotometria e as lâminas de NBT sugerem que a produção de EROs por neutrófilos em contato com titânio é maior que a produzida por contato com Zircônia normal que, por sua vez é maior do que a produzida por contato com Zircônia Sinterizada.
- ❖ A microscopia eletrônica de varredura sugere que as rugosidades e reentrâncias das superfícies testadas são importantes para permitir uma melhor fixação dos neutrófilos.

PERSPECTIVAS

O presente trabalho poderia ter resultados e estatísticas mais significativas, se a mesma metodologia fosse aplicada a um maior número de indivíduos. Seria interessante um trabalho em equipe, uma vez que cada experimento é muito longo, requer equipamentos diversos, muitas vezes em outros laboratórios, e com eventos

simultâneos, o que torna praticamente inviável uma só pessoa tentar fazer todos os passos.

A próxima etapa poderia ser a repetição, com um n maior de doadores, para conseguirmos resultados mais significativos.

A análise proteômica das amostras conseguidas poderia nos mostrar o tipo de modificação pós-traducional mais prevalente ou qual delas está ligada a um tipo de condição testada.

Há muitos estudos recentes sobre implantes de zircônia com índices de sucesso de 74% a 98% entre 1 e 5 anos de acompanhamento pós-operatório, e 79,6% a 91,6% depois da prótese instalada. Todavia, vários autores enfatizam a necessidade de estudos abrangentes e bem controlados numa população maior, para que a zircônia possa ser indicada como substituta do titânio (OSMAN, 2015).

Osman e colaboradores (2015) também relatam que outros pesquisadores fizeram cultura de células e observaram que células semelhantes a osteoblastos se depositaram igualmente sobre superfícies de titânio ou de zircônia. Já outros estudos descrevem superfícies tratadas de zircônia apresentando uma maior adesão, proliferação e diferenciação dos osteoblastos. Outro passo interessante seria repetir a metodologia aplicada, mudando-se o modelo de célula do sistema imunológico, para uma célula mesenquimal indiferenciada, para ver em que tipo de célula ela se diferenciaria e como se comportaria nas superfícies testadas.

Seria interessante estabelecer se a proliferação ou atração de osteoblastos para a superfície de implantes depende do desencadeamento de sinalização iniciada pelo contato com os neutrófilos, ou se a relação com os osteoblastos prescinde dessa primeira relação com os neutrófilos.

E, embora não relacionado à pesquisa desta dissertação, pela revisão da literatura, vê-se que, em breve, os implantes serão confeccionados individualmente para cada paciente, por meio de uma impressora 3D (ABDUO, 2014)(WÄTJEN, 2014), o que já é possível ser feito em Brasília.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUO, J.; LYONS, K.; BENNAMOUN, M. Trends in computer-aided manufacturing in prosthodontics: A review of the available streams. *Int. J. Dent.* 2014, 1-15. 2014.
- AKAGAWA, Y.; ICHIKAWA, Y.; NIKAI, H.; TSURU, H. Interface histology of unloaded and early loaded partially stabilized zirconia endosseous implant in initial bone healing. *J. Prosthet. Dent.* 69, 599–604. 1993.
- AL-NAWAS, B; DOMAGALA, P; FRAGOLA, G; FRIENBERG, P; ORTIZ-VIGÓN, A; ROUSSEAU, P; TONDELA, J. – A prospective noninterventional study to evaluate survival and success of reduced diameter implants made from titanium-zirconium alloy. *J. Oral Imp.*, v. 41 (4), p. e118-e125, 2015.
- ALTUNA, P.; LUCAS-TAULÉ, E.; GARGALLO-ALBIOL, J.; FIGUERAS-ÁLVAREZ, O.; HERNÁNDEZ-ALFARO, F.; NART, J. Clinical evidence on titanium-zirconium dental implants: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* Jul;45(7):842-50. 2016. doi: 10.1016/j.ijom.2016.01.004. PMID: 26852292
- BAINTON, D.F.; ULLYOT, J.L.; FARQUHAR, M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med*143:907-934. 1971.
- BERNER, S.; DARD, M.; GOTTLOW, J.; MOLENBERG, A.; WIELAND, M. Titanium-zirconium: A novel material for dental implants. *Eur. Cells Mater.* 17, 16. 2009.
- BOELTZ, S.; MUÑOZ, L.E.; FUCHS, T.A.; HERRMANN, M. - Neutrophil extracellular traps open the Pandora's Box in severe malaria. *Frontiers in Immunology.* v. 8, July 2017. doi:10.3389/fimmu.2017.00874
- BOSSOM, J.A.; BLOMBREG, A.; STENFORS, N.; HELLEDAY, R; DEHNDIG, A.F.; MUDWAY, A.S. Peripheral Blood Neutrophilia as a Biomarker of Ozone-Induced Pulmonary Inflammation. *Plos* dec. 2013. doi.org/10.1371/journal.pone.0081816
- CAMPOS, V.; MELO, R.C.N.; SILVA, L.P.; AQUINO, E.N.; CASTRO, M.S.; FONTES, W. Characterization of neutrophil adhesion to different titanium surfaces. *Bull. Mater. Sci.*, v. 37, n. 1, p. 157-166, 2014.
- CANNIZZARO, G.; TORCHIO, C.; FELICE, P.; LEONE, M.; ESPOSITO, M. Immediate occlusal versus non-occlusal loading of single zirconia implants. A multicentre pragmatic randomized clinical trial. *Eur. J. Oral Implantol.* 3, 111-120.
- CATALANI, S.; STEA, S.; BERAUDI, A. et al., “Vanadium release in whole blood, serum and urine of patients implanted with a titanium alloy hip prosthesis,” *Clinical Toxicology*, vol. 51, no. 7, p. 550-556, 2013.

- CIONCA, N.; MÜLLER, N.; MOMBELLI, A. Two-piece-zirconia implants supporting all-ceramic crowns. A prospective clinical study. *Clin. Oral Implants Res.* 2014. doi:10.1111/clr.12370.
- CLARK, R.A.; SZOT, S. The myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system as effector of neutrophil-mediated tumor cell toxicity. *J. Immunol.* 126:1295-1301. 1981.
- DA CUNHA, G.F. Tática Kamikaze transforma os cromossomos em armas mortais! Teliga.net disponível em <http://www.teliga.net/2011/10/tatica-kamikaze-transforma-os.html> acessado em 04.05.2016
- DA ROSA, E.L.S. – **Análise morfológica e proteômica da captação de nanopartículas de dióxido de titânio por neutrófilos humanos *in vitro*.** [Tese de Doutorado]. Universidade de Brasília, 2012. 222 p.
- DANCEY, J.T.; DEUBELBEISS, K.A.; HARKER, L.A.; FINCH, C.A. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest.* **58**:705–715. 1976.
- deCATHELINÉAU, A.M.; HENSON, P.M. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem.* **39**:105-117. 2003.
- DEGIDI M, ARTESE L, SCARANO A, PERROTI V, GEHRKE P, PIATTELLI A. Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. **J Periodontol.** **77**(1):73-80. Jan 2006. DOI: 10.1902/jop.2006.77.1.73
- DINNYES, A.; DE SOUSA, P.; KING, T.; WILMUT, I. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. **Cloning Stem Cells**; 4331-90. 2002.
- DOMINGO, J.L. “Reproductive and developmental toxicity of aluminum: a review,” *Neurotoxicology and Teratology*, vol. 17, no. 4, p. 515-521, 1995.
- EL BENNA, J.; HURATDO-NEDELEC, M.; MARZAIOLI, V.; MARIE, J-C; GOUGEROT-POCIDALO, M-A; DANG, P.M-C. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. **Immunol. Rev.** **273**:180-193. 2016.
- EL HAG, A.; CLARK, R.A. Down-regulation of human natural killer activity against tumors by the neutrophil myeloperoxidase system and the hydrogen peroxide. **J. Immunol.** **133**:3291-3297. 1984.
- ÖZKURT, Z.; KAZAZOĞLU, E. Zirconia dental implants: a literature review. **J Oral Implantol.** Jun;**37**(3):367-76. 2011. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-09-00079. PMID: 20545529
- ELIAS, C.N.; FERNANDES, D.J.; RESENDE, C.R.; ROESTEL, J. Mechanical properties, surface morphology and stability of a modified commercially pure

- high strength titanium alloy for dental implants. **Dent Mater.** Feb;**31**(2):e1-e13. 2015. doi: 10.1016/j.dental.2014.10.002. PMID: 25458351
- ENGLISH, D. **The Remarkable Neutrophil!** Developing a Blueprint for Integrated Cellular Signaling *in* GABRILOVICH, D.I. The neutrophils: new outlook for old cells, 2 ed. London: Imperial College Press. 2005.
- FONSECA, M.P. - **Proteômica abrangente de alta resolução na análise de neutrófilos humanos ativados pelo peptídeo *formyl Methyl Leucyl Phenilalanine* (fMLP)** [Tese de Doutorado]. Universidade de Brasília, 2017. 152 p.
- FRIDLENDER, Z.G.; SUN, J.; KIM, S.; KAPOOR, V; CHENG, G.; LING, L.; WORTHEN, G.S.; ALBELDA, S.M. - Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. **Cancer Cell** **16**, 183–194, September 8, 2009. DOI 10.1016/j.ccr.2009.06.017
- GABRILOVICH, D.I. **The neutrophils:** new outlook for old cells, 2 ed. London: Imperial College Press. 2005.
- GARDAI, S.J.; MCPHILLIPS, K.A.; FRASCH, S.C., et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell.* **123**:321–334. 2005.
- GAHLERT, M.; BURTSCHER, D.; GRUNERT, I.; KNIHA, H.; STEINHAUSER, E. Failure analysis of fractured dental zirconia implants. *Clin. Oral Implants Res.* **23**, 287-293. 2012.
- GAHLERT, M.; ROEHLING, S.; SPRECHER, C.M.; KNIHA, H.; MILZ, S.; BORMANN, K. *In vivo* performance of zirconia and titanium implants: A histomorphometric study in mini pig maxillae. *Clin. Oral Implants Res.* **23**, 281-286. 2012.
- GUIMARÃES-COSTA, A.B.; ROCHAEL, N.C.; OLIVEIRA, F.; ECHEVARRIALIMA; J.; SARAIVA, E.M. Neutrophil Extracellular Traps Reprogram IL-4/GM-CSF-Induced Monocyte Differentiation to Anti-inflammatory Macrophages. **Front. Immunol.** **8**:523, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.00523
- HANSEN, D.C. “Metal corrosion in the human body: the ultimate bio-corrosion scenario,” *Interface*, v. 17, p. 31-34, 2008.
- HAO, L.; LAWRENCE, J.; CHIAN, K.S. Osteoblast cell adhesion on a laser modified zirconia based bioceramic. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **16**, 719-726. 2005.
- JEREMY, - Medic Guide (2008) disponível em: <http://medicguide.blogspot.com/2008/05/what-are-polymorphs.htm> acessado em 21.06.2017 às 10:28 h.
- KEEGAN, G.M.; LEARMONTH, I.D.; CASE, C.P. “Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: a review of current knowledge and future strategies,” *The Journal of Bone & Joint Surgery* - British Volume, vol. 89, no. 5, p. 567-573, 2007.

- KIRMANIDOU, Y.; SIDIRA, M.; DROSOU, M.E.; BENNANI, V.; BAKOPOULOU, A.; TSOUKNIDAS, A.; MICHAILEDIS, N.; MICHALAKIS, K. New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. **Biomed Res Int.** **2016**:2908570. 2016. doi: 10.1155/2016/2908570. PMID: 26885506
- KLAUSEN P, BJERREGAARD MD, BORREGAARD N, COWLAND JB. End-stage differentiation of neutrophil granulocytes in vivo is accompanied by up-regulation of p27kip1 and downregulation of CDK2, CDK4, and CDK6. **J. Leukoc. Biol.** **75**:569–578. 2004.
- KJELDSEN, L.; BAINTON, D.F.; SENDELØV, H.; BORREGAARD, N. Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. **Blood** **82**:3183-3191. 1993.
- KOHAL, R.J.; KNAUF, M.; LARSSON, B.; SAHLIN, H.; BUTZ, F. One-piece zirconia oral implants: One-year results from a prospective cohort study. 1. Single tooth replacement. *J. Clin. Periodontol.* **39**, 590–597. 2012.
- KOHAL, R.J.; WENG, D.; BÄCHLE, M.; STRUB, J.R. Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: An animal experiment. *J. Periodontol.* **75**, 1262–1268. 2004.
- KURTZ, S.; ONG, K.; LAU, E.; MOWAT, F.; HALPERN, M. “Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030,” *The Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*, vol. 89, no. 4, p. 780-785, 2007.
- LAHOZ-BENEYTEZ, J.; ELEMANS, M.; ZHANG, Y. et al. Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood.* **127**:3431-3438. 2016.
- LEONARD, A.; LAUWERYS, R. “Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of cobalt metal and cobalt compounds,” *Mutation Research*, vol. 239, no. 1, p. 17-27, 1990.
- LEVIN, R.; GRISNTEIN, S.; CANTON, J. The life cycle of phagosomes: formation, maturation and resolution. **Immunol. Rev.** **273**:156-179. 2016.
- MCCRACKEN, M. Dental implant materials: Commercially pure titanium and titanium alloys. *J. Prosthodont.* **8**, 40-43. 1999.
- MCLEISH, K.R.; MERCHANT, M.L.; KLEIN, J.B.; WARD, R.A. Technical note: proteomic approaches to fundamental questions about neutrophil biology. **Journal of Leukocyte Biology** v. **94** n. 4, p. 683-692, 2013.
- MILLER LJ, BAINTON DF, BORREGAARD N, SPRINGER TA. Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. **J Clin Invest.** **80**:535-544. 1987.

- MOLLINEDO F, GAJATE C, SCHNEIDER DL. Cytochrome b co-fractionates with gelatinase-containing granules in human neutrophils. **Mol Cell Biochem.**105:49-60. 1991.
- MOLLINEDO F, SCHNEIDER DL. Subcellular localization of cytochrome b and ubiquinone in a tertiary granule of resting human neutrophils and evidence for a proton pump ATPase. **J Biol Chem.** 259:7143-7150. 1984.
- MORA-JENSEN H, JENDHOLM J, FOSSUM A, PORSE B, BORREGAARD N, THEILGAARD-MONCH K. Technical advance: immunophenotypical characterization of human neutrophil differentiation. **J Leukoc Biol.** 90:629-634. 2011.
- MORGAN, M.J.; JAMES, D.F.; PILLIAR, R.M. Fractures of fixture component of an osseointegrated implant. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 8, 409-414. 1993.
- NAUSEEF, W.M. Myeloperoxidase in human neutrophil host defense. **Cell Microbiol.** 16:1146-155, 2014
- NAUSEEF, W.M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nat Immunol.** 15:602-611, 2014.
- NAUSEEF, W.M. - Neutrophils, from cradle to grave and beyond. *Immunological Reviews* 273: 5-10, 2016. DOI: 10.1111/imr.12463
- NAWAZ, M.; FATIMA, F - Extracellular vesicles, tunnelling nanotubes, and cellular interplay. **Front. Mol. Biosci** v.4:50, july 2017 doi: 10.3389/fmolb.2017.00050
- NEVES, A.C.D. – **Análise proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos ativados por n-formil-metionil-leucil-fenilalamina (fMLP).** [Dissertação de Mestrado]. Universidade de Brasília, 2010. 152 p.
- OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E.E.; HUTTENLOGGER, A. Neutrophil heterogeneity and plasticity. *Nature reviews Immunology* 16, 378-391, 2016. doi:10.1038/nri.2016.49
- OSMAN, R.B.; MA, S.; DUNCAN, W.; DE SILVA, R.K.; SIDDIQI, A.; SWAIN, M.V. Fractured Zirconia implants and related implant designs: Scanning electron microscopy analysis. *Clin. Oral Implants Res.* 24, 592–597. 2013.
- OSMAN, R.B.; SWAIN, M.V. A critical review of dental implant materials with emphasis on titanium versus zirconia. **Materials** 8:932-958. 2015 doi:10.339/ma8030932
- OSMAN, R.B.; SWAIN, M.V.; ATIEH, M.; MA, S.; DUNCAN, W. Ceramic implants (Y-TZP): Are they a viable alternative to titanium implants for the support of overdentures? A randomized clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.* 25, 1366-1377. 2014.
- ÖZKURT, Z.; KAZAZOĞLU, E. Zirconia dental implants: a literature review. **J Oral Implantol.** Jun;37(3):367-76. 2011. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-09-00079. PMID: 20545529

- PARR, G.R.; GARDNER, L.K.; TOTH, R.W. Titanium: The mystery metal of implant dentistry. Dental materials aspect. *J. Prosthet. Dent.* 54, 410-414. 1985.
- PAYER, M.; HESCHL, A.; KOLLER, M.; ARNETZL, G.; LORENZONI, M.; JAKSE, N. All-ceramic restoration of zirconia two-piece implants - A randomized controlled clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.* 2014. doi:10.1111/clr.12342.
- PESSOA, R.S.; SOUSA, R.M.; PEREIRA, L.M.; NEVES, F.D.; BEZERRA, F.J.; JAECQUES, S.V.; SLOTEN, J.V.; QUIRYNEN, M.; TEUGHEL, W.; SPINNETO, R. Bone Remodeling Around Implants with External Hexagon and Morse-Taper Connections: A Randomized, Controlled, Split-Mouth, **Clinical Trial.** *Clin Implant Dent Relat Res.* Feb;19(1):97-110. 2017. doi: 10.1111/cid.12437. PMID: 27353076
- RAMADASS, M.; CATZ, S.D. Molecular mechanisms regulating secretory organelles and endosomes in neutrophils and their implication for inflammation. *Immunol. Rev.* 273:249-265. 2016.
- RESENDE, R – **La modernaj dentaj implantoj** in McCOY, R.(org.) IKU – Internacia Kongresa Universitato – 87-a Universala Kongreso de Esperanto, Fortaleza, UEA, p. 116-123, 2002.
- RICE, W.G.; GANZ, T.; KINKADE, J.M.; SELSTED, M.E.; LEHRER, R.I.; PARMLEY, R.T. Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood* 70:757-765. 1987.
- RICE, W.G.; KINKADE, J.M.; PARMLEY, R.T. High resolution of heterogeneity among human neutrophil granules: physical, biochemical, and ultrastructural properties of isolated fractions. *Blood* 68:541-555. 1986.
- RODRÍGUEZ-MERCADO, J.J.; ROLDAN-REYES, E.; ALTAMIRANO-LOZANO, M. “Genotoxic effects of vanadium(IV) in human peripheral blood cells,” *Toxicology Letters*, vol. 144, no. 3, p. 359-369, 2003.
- SCAPINI, P.; CASSATELLA, M.A.; Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood.* 124:710-719, 2014.
- SCHULTZE-MOSGAU, S.; SCHLIEPHAKE, H.; RADESPIEL-TROGER, M.; NEUKAM, F.W. Osseointegration of endodontic endosseous cones: Zirconium oxide vs titanium. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 89, 91-98. 2000.
- SIGMA-ALDRICH / MERCK Products 2017. Bula disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11585029001?lang=pt®ion=BR> , acessado em 11.10.2017.
- SHAEFER, L. Complexity of damage: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem.* 289:35237-35245. 2014.

- SILVA, V.C. – **Caracterização morfológica e funcional da adesão de neutrófilos em diferentes superfícies de titânio.** [Tese de Doutorado]. Universidade de Brasília, 2011. 106 p.
- SINGEL, K.L.; SEGAL, B.H. Neutrophils in the tumor microenvironment: trying to heal the wound that cannot heal. *Immunol Rev.* **273**:329–343. 2016.
- SUMMERS, C.; RANKIN, S.M.; CONDLIFFE, A.M.; SINGH, N.; CHILVERS, E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* **31**:318-324, 2010.
- SUND, J.; PALOMÄKI, J.; AHONEN, N.; SAVOLAINEN, K.; ALENIOUS, H.; PUUSTINEN, A. Phagocytosis of nano-sized titanium trigger changes in protein acetylation. *Journal of proteomics* v. **108** p. 469-483, 2014.
- TAPPER H, FURUYA W, GRINSTEIN S. Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules. *J. Immunol.* **168**:5287–5296. 2002.
- TOUSSAINT, M.; JACKSON, D.J.; SWIEBODA, D. et. all. Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nature Medicine* **23**, 681–691 , 2017. doi:10.1038/nm.4332
- TREFFERS, L.W.; HIEMSTRA, I.H.; KUIJPERS, T.W.; van den BERG, T.K.; MATLUNG HL. Neutrophils in cancer. *Immunol Rev.* **273**:312–328. 2016.
- VIRELLA, G.(ed.) **Medical Immunology**, 6 ed. New York, Informa. 2007.
- WÄTJEN, A.M.; GINGTER, P.; KRAMER, M.; TELLE, R. Novel prospects and possibilities in additive manufacturing of ceramics by means of direct inkjet printing. *Adv. Mech. Eng.* 2014. doi:10.1155/2014/141346.
- WELANDER, M.; ABRAHAMSSON, I.; BERGLUNDH, T. The mucosal barrier at implant abutments of different materials. *Clin. Oral Implants Res.* **19**, 635-641. 2008.
- WILSONM, V.G. (ed.) **Sumoylation: Molecular Biology and Biochemistry.** Horizon Bioscience. 2004. ISBN 0-9545232-8-8.
- ZHANG, Y.; SAILER, I.; LAWN, B.R. Fatigue of dental ceramics. *J. Dent.* **41**, 1135-1147. 2013.

Apêndice

A. Protocolo de separação de neutrófilos pelo método Percoll, aprimorado pelo Grupo de Pesquisa em Proteômica de Neutrófilos da Universidade de Brasília

Separação de Neutrófilos para análise de proteomas:
Arquivo: Separacao_de_Neutrofilos_m6_w20_a1_r2.docx
Atualizado em 25-set-1717:56

Separação de neutrófilos- método Percoll

Resumo do fluxo de trabalho

Na véspera: autoclavar o material a ser usado, localizar todos os materiais necessários, preparar as soluções para montagem dos gradientes, pesar NBT, DTT e SDS (não prepare estas soluções na véspera, só pese para adiantar), verificar e, se necessário, preparar sol. estoque de inibidores e de ativadores;

Limpar e ligar o fluxo laminar e o UV, gelar as caçambas, ligar a centrífuga

Preparar o material para coleta de sangue

Siga o fluxo de trabalho do arquivo "timeline"

Montar o gradiente nos tubos

Colher o sangue

Colocar sobre o gradiente, separar alíquota para plasma e centrifugar

Preparar o NBT, o isopor com gelo e o tampão de lise (enquanto centrifuga)

Lavar as células (para tirar o percoll)

Guardar o plasma e preparar as soluções para hemólise (enquanto centrifuga)

Hemólise

Ressuspensão em plasma/HBSS; alíquota para microscopia

Contagem e preparo das lâminas do panótico

Ajuste de concentração de células

Preparo dos ativadores e do NBT com ativadores

Ativação

Alíquotas p/ NBT colorimétrico e NBT lâmina, complementar com NBT e ativador

Lavagem do plasma

Centrifugação do NBT lâmina

Colocação de ácido acético e etanol no NBT colorimétrico (enquanto centrifugam a lavagem e a lâmina)

Espectrofotometria do NBT

Lise de neutrófilos

Leitura de lâminas (panótico e NBT)

Materiais e Reagentes

Tubos falcon 15mL e/ou 50mL, estéreis (no mínimo 4 tubos de 15mL e 2 tubos do de 50mL)

Ponteiras de 1000µL, de 200µL e de 10µL estéreis (1 caixacheia de cada, autoclavadas)

Soluções de HBSS sem cálcio e magnésio, Sigma, 10 X (dez vezes concentrada) (600 µL por Falcon de 15), 2X(10 mL) e 1X (21 mL por Falcon de 15), com pH ajustado para 7.40 (entre 7.35 e 7.45) utilizando NaOH 0,1mol/L, filtradas em filtro esterilizante e armazenadas em frascos estéreis.

Solução de HBSS com cálcio e magnésio, Sigma, 1X, com pH ajustado para 7.35-7.45, filtrada em filtro esterilizante e armazenadas em frascos estéreis

Água Milli-Q estéril

Percoll 100% Amersham Bioscience $\rho = 1,131\text{g/mL}$ estéril

Água milli-Q estéril (filtro esterilizante ao final da produção) (20 mL)

Suporte para tubos falcon de 15mL e 50mL

Isopor com gelo para colocar tubos Falcon

Papel higiênico ou papel toalha

Seringa estéril de 20mL e/ou 10mL e agulhas (para coleta do sangue, ver protocolo específico)

Pipetas de 5000µL, 1000µL, 200µL e 10µL

Pinça estéril

Pincel para rotular

Álcool 70%

Frasco com tampa contendo hipoclorito 0,2% para descarte de material contaminado com sangue.

Câmara de Neubauer com lamínula especial (verificar se estão limpas)

Lâminas de vidro (sem lamínula)

Corante azul de tripan 0,2% em HBSS sem cálcio e magnésio (diluir a partir do estoque 4x, vortexar, sonicar e filtrar antes do uso), serão necessários 50 µL.

Corante panótico (reagentes 1, 2 e 3) em frascos apropriados para imersão de lâminas.

Preparo dos Reagentes

O preparo dos materiais e reagentes para utilização pode ser realizado no dia que antecede o experimento.

Autoclavar todos os frascos de armazenagem das soluções, ou então utilizar tubos falcon esterilizados por óxido de etileno.

Autoclavar também todas as caixas de ponteiras, embrulhando-as em papel apropriado para autoclave.

Ligar o fluxo laminar e limpar o interior com álcool 70%. Limpar também com álcool 70% todos os materiais a serem colocados no fluxo inclusive suportes, pincel para rotular tubos, pinça, caixas de ponteiras, vasilha de descarte com hipoclorito 0,2%, pipetase frascos de soluções.



Colocar no fluxo os frascos autoclavados, as soluções que serão filtradas e o filtro millipore já autoclavado.

Ajuste o pH dos tampões HBSS para 7.40 (entre 7.35 e 7.45) utilizando NaOH 0,1 mol/L: A partir do frasco estoque (Sigma) de HBSS 10x, retire 2 alíquotas de 45 mL e armazene em 2 tubos Falcon estéreis (procedimento feito no fluxo laminar). Leve esses 2 tubos ao pHmetro, ajuste o pH adicionando inicialmente 2,3 mL de NaOH 0,1 mol/L (estéril) e completando gota a gota até atingir pH entre 7.35 e 7.45. A seguir, retorne o material ao fluxo laminar, passe a solução em filtro estéril e armazene em novos tubos Falcon estéreis e identificados.

Ligar luz UV por 15 minutos já com todo o material limpo dentro do fluxo. Não se exponha ao UV (não realize nenhum procedimento no fluxo quando o UV estiver ligado)



Filtrar as soluções dentro do fluxo, no filtro millipore previamente autoclavado, utilizando uma bomba de vácuo ou seringa para pequenos volumes. Transferir as soluções filtradas para os frascos autoclavados e armazená-los em geladeira até o momento do uso. Não os abrir fora do fluxo previamente esterilizado com luz UV. Utilizar luvas novas, sem talco para este procedimento.

Observações gerais

Usar sempre água Milli-Q estéril no preparo das soluções.

Antes de começar o preparo de uma solução, localize e verifique as quantidades de todos os componentes.

Lavar muito bem e autoclavar os frascos onde for armazenar as soluções e a vidraria que for usar para preparar as soluções.

Anote sempre no seu livro ata o fabricante e o lote de cada composto usado no preparo de cada solução

Anote no frasco de cada solução preparada o nome da solução, a data do preparo e seu nome.

Em todas as etapas deve ser usado apenas material plástico, pois vidro ativa neutrófilos.

Todos os materiais e reagentes devem ser estéreis e livres de pirógenos.

Toda manipulação deve ser feita delicadamente para evitar choque mecânico.

Ao ressuspender as células, fazer com cuidado para evitar choque mecânico, mas com força suficiente para suspender o pellet.

Nos gradientes em tubos de 50 mL não se formará o halo de neutrófilos, sendo necessário sugar até próximo do pellet de hemácias para se obter alto rendimento na separação.

Observar aglomeração de células durante o processo. Grumos difíceis de separar indicam ativação das células, portanto a amostra não poderá ser usada.

Pipetar com muito cuidado e certificar-se de que as pipetas estão calibradas.

Ao usar o fluxo laminar:

Planeje todo o trabalho antes de iniciar

Evite o trânsito durante a utilização, principalmente abrir e fechar portas

Desinfete a superfície interna da cabine com etanol 70% e espere secar

Somente coloque no fluxo o material necessário para o procedimento

Não obstrua as grades frontais e traseiras de retorno de ar

Mantenha todos os materiais a pelo menos 10 cm dentro do caixilho

**Feche o "sash" – vidro frontal (*caso esteja utilizando o fluxo novo)*

Ligue UV por 15 min antes do uso

Desligue o UV, abra lentamente o "sash" até a altura ideal de trabalho e ligue a luz fluorescente

Ligue a cabine (motor) e deixe operar por 5 min

Lave as mãos e antebraços com antisséptico, utilização obrigatória de jaleco (de preferência com elástico no punho) e luvas

Separe o material limpo do contaminado na área de trabalho

Evite o movimento de materiais contaminados dentro da área limpa

Realize todas as operações contaminadas na parte traseira da área de trabalho

Mantenha o material contaminado para descarte na região traseira da cabine

Mantenha caixas de ponteiros, eppendorfs e outros materiais estéreis fechadas, abra somente quando necessário

Evite passar as mãos por cima de materiais estéreis, sempre manipular por trás ou pelas laterais

Não coloque as tampas dos frascos de boca virada para o piso do fluxo.

Não toque em nenhum objeto fora do fluxo se ainda for manipular materiais dentro dele

Após completar o trabalho, a cabine deve operar durante 2-3 min

Desinfete com álcool 70% ao final do uso

Desligue luz fluorescente, ligue a UV por 10 minutos e então desligue o motor da cabine

Antissepsia das mãos e braços

Preparo do Experimento

Ligar a centrífuga ROTOFIX 32A(HETTICH Zentrifuge), colocar duas caçambas de falcon (dependendo do protocolo de uso 15mL ou 50mL) no freezer -22°C.

Colocar os tubos estéreis vazios para a montagem dos gradientes com pinça sobre o suporte de tubos, dentro do fluxo laminar, com as respectivas

tampas. Gastamos 2 tubos falcon para o preparo das soluções do gradiente. O tubo usado para preparo do gradiente menos denso (60% ou 58%) será o mesmo utilizado para a montagem do gradiente final (menos denso sobre mais denso).

Separação de neutrófilos

Preparo de gradientes de percoll para isolamento dos neutrófilos a partir do sangue venoso periférico.

Este procedimento é realizado dentro do fluxo laminar, com muito cuidado para evitar contaminação.

- **Para montagem dos gradientes:**

- As soluções devem estar em temperatura ambiente.
- Prepare as soluções de acordo com as tabelas abaixo, de acordo com o sexo do doador e com o volume do tubo Falcon que pretende utilizar.
- Você vai preparar duas soluções de Percoll com densidades e porcentagens de Percoll diferentes. Homogeneíze cada uma dessas duas soluções de Percoll apenas após pipetar todos os componentes, porém antes de montar o gradiente, enquanto as duas soluções ainda estão em tubos separados. Faça isso invertendo o tubo tampado 5x com cuidado, evitando gotas na lateral dos tubos.
- Sempre mantenha os tubos tampados quando não estão sendo manipulados. Aspire e ejete o percoll mais lentamente porque ele é muito denso (a pipetagem rápida pode gerar volumes imprecisos).
- Após o início da montagem do gradiente movimente o tubo o mínimo possível.
- Evite ao máximo a presença de bolhas de ar.
- Para adicionar os componentes do gradiente encoste a ponteira na lateral do tubo, inclinando a pipeta aproximadamente 30 graus e então adicione o gradiente. As soluções devem ser adicionadas sempre pela parede do tubo. Estes procedimentos devem ser feitos para se evitar contaminação da solução e a perda de material pela parede do tubo, o que pode alterar a densidade final da solução gradiente.

Preparo do gradiente de percoll com HBSS para falcon de 15 mL (3mL de sangue)

- **Adicione primeiro a solução mais densa:** Ao fundo do tubo coloque 3 mL da solução mais densa (70 ou 68%).
- **Depois adicione a solução menos densa:** De forma lenta e contínua, adicione os 3 mL da solução menos densa por cima da solução mais densa (60% ou 58%), com uma pipeta.

O processo de liberação do gradiente pela pipeta deve ser lento e durar aproximadamente um minuto, para que a interface entre os gradientes não seja desfeita. O primeiro mL deve ser inserido com muita calma, muito lentamente, pois ficará na interface com o gradiente mais denso e pode se difundir mais facilmente se houver movimentação.

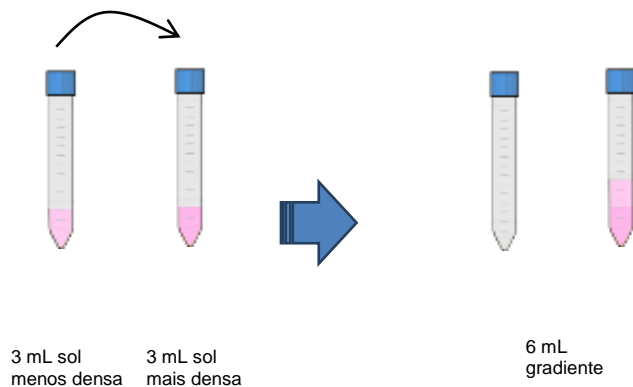
- ❖ Utilizar esta tabela para sangue de doadores do sexo masculino:

Reagentes	60% (3mL)	70%(3mL)
Percoll 100%	1800µL	2100 µL
HBSS 10X	300 µL	300µL
Água	900 µL	600 µL

- ❖ Ou esta para feminino:

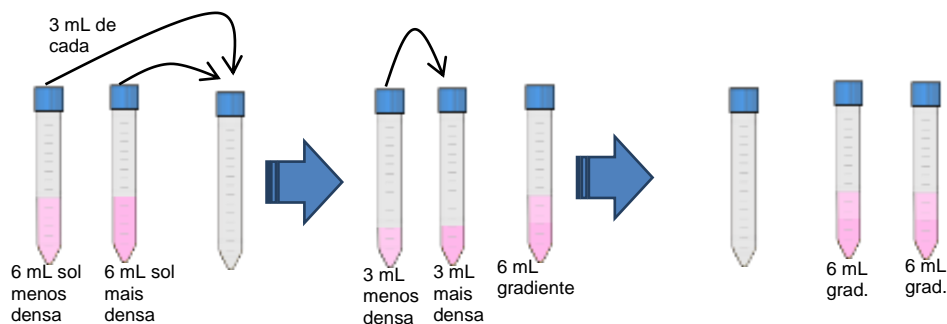
Reagentes	58% (3mL)	68% (3mL)
Percoll 100%	1740 µL	2040 µL
HBSS 10X	300µL	300µL
Água	960 µL	660 µL

Somente monte o gradiente (2 soluções num tubo) após a coleta do sangue. Se for usar apenas um tubo, prepare cada solução em um tubo diferente, depois coloque a menos densa por cima da mais densa.



Se for usar mais que um tubo, prepare todo o volume necessário da mais densa em um tubo e todo o volume necessário da menos densa em outro tubo. Monte os gradientes em tubos novos, exceto o último, que deve ser montado no tubo onde foi preparada a solução mais densa. Por exemplo, se for usar dois tubos de gradiente, prepare um com 6 mL da solução mais densa e outro com 6 mL da solução menos densa. Monte um gradiente num terceiro tubo (3 mL da mais densa em baixo, 3 mL da menos densa em cima) e depois monte o outro gradiente no tubo em

que estava a solução mais densa, apenas colocando os 3 mL da menos densa por cima.



Pule a próxima descrição deste protocolo (gradiente para Falcon de 50 mL) e continue na etapa de lavagem.

Se precisar calcular tabelas para volumes diferentes, use a planilha em <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1i8ksBUjzwwZTpZEVf7V9qjTHEZdh5UTnfOi0GvX-es/edit?usp=sharing>

Preparo do gradiente de percoll com HBSS para falcon de 50 mL (12mL de sangue)

Obs.: o preparo do gradiente de 50 mL é diferente do de 15mL (os volumes e concentrações são diferentes).

- Adicione **primeiro a solução mais densa**: Ao fundo do tubo coloque **12 mL** da solução mais densa (70%).
- **Depois adicione a solução menos densa**: De forma lenta e contínua, adicione os **12 mL** da solução menos densa por cima da solução mais densa (60% ou 58%), com uma pipeta.

Encha a ponteira com 4 mL da solução menos densa (60% ou 58%) tomando cuidado com bolhas.

Insira lentamente sobre o gradiente mais denso escorrendo pela parede. Use a pipeta de 5 mL, repetindo o procedimento até completar 12 mL.

O processo de liberação do gradiente pela pipeta deve ser lento e durar aproximadamente um minuto, para que a interface entre os gradientes não seja desfeita. O primeiro mL deve ser inserido com muita calma, muito lentamente, pois ficará na interface com o gradiente mais denso e pode se difundir mais facilmente se houver movimentação.

- ❖ Utilizar esta tabela para sangue de doadores do sexo **masculino**:

Reagentes	60%(12mL)	70%(12mL)
Percoll 100%	7200 μ L	8400 μ L
HBSS 10X	1200 μ L	1200 μ L
Água	3600 μ L	2400 μ L

- ❖ Ou esta para **feminino**:

Reagentes	58%(12mL)	70%(12mL)
Percoll 100%	6960 μ L	8400 μ L
HBSS 10X	1200 μ L	1200 μ L
Água	3840 μ L	2400 μ L

Se precisar calcular tabelas para volumes diferentes, use a planilha em <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1li8ksBUjzwzZTpZEVf7V9qjTHEZdh5UTnfOi0GvX-es/edit?usp=sharing>

Finalização da montagem dos gradientes (para qualquer tamanho de tubo)

Após a montagem do gradiente, verifique a interface das soluções: um olho treinado consegue ver pois a cor do gradiente mais denso é mais forte (no caso de gradientes que utilizam HBSS com vermelho de fenol). A divisão entre os gradientes deve ser observada como uma linha. A transição entre eles não deve ser gradual.

- Deixe o suporte de tubos falcon bem fixo à base do fluxo. Se necessário prenda com fita crepe para evitar movimentações durante a montagem do gradiente (lembre-se de tirar a fita e descartar ao final do experimento).

Observação: *Após a montagem dos gradientes mantenha todas as soluções (HBSS 1X, HBSS 2X, água Milli-Q e HBSS 1X com Cálcio e Magnésio) no gelo*

Processamento do sangue

Logo após a montagem do gradiente é feita a coleta de sangue.

O volume de sangue coletado deve ser suficiente para montar o gradiente e também para fornecer plasma para a etapa de ativação. Use 2 mL para montagens com até 24 mL de sangue sobre o gradiente. Ex: Se pretende preparar 2 tubos com 3 mL de sangue em cada, serão coletados 8 mL e separados 2 mL para obtenção de plasma; Se pretende preparar 2 tubos com

12 mL de sangue em cada, serão coletados 26 mL e separados 2 mL para obtenção de plasma.

Cada três mL de sangue devem conter 30 U.I. de heparina (6µL de heparina a 5000 UI/mL). A heparina deve ser conservada em temperatura ambiente. Toda face interna da(s) seringas deve(m) ser heparinizada(s), o que corresponde aproximadamente às 30 U.I. necessárias.

Ver **protocolo de coleta de sangue** para detalhes do procedimento.

Antes de adicionar o sangue coletado ao tubo com o gradiente, separe 2 mL do sangue em um tubo e deixe sedimentar na estante enquanto coloca o sangue sobre o gradiente para separação dos neutrófilos. (OBS:;) Esse tubo será centrifugado junto com o tubo do gradiente (apenas na primeira centrifugação) para se obter o plasma para se fazer a suspensão final de neutrófilos.

Para adicionar o sangue ao tubo do gradiente encoste a agulha da seringa na parede do tubo, com o bisel voltado para a parede do tubo bem próximo do gradiente. Tome muito cuidado para que a primeira gota não caia muito rápido, e adicione lentamente até que se forme uma base. Após ter uma base de aproximadamente 3mL para tubos de 50 ou 1 mL para tubos de 15 mL pode-se inserir um pouco mais rápido o volume remanescente da seringa até completar 12mL por tubo de 50 mL ou 3 mL para os tubos de 15 mL. (Procedimento realizado no fluxo laminar)

Certifique-se de fechar bem a tampa do tubo antes da centrifugação.

Centrifugação do gradiente

Para gradiente em FALCON de 50mL:

São dois tubos a serem centrifugados: O tubo contendo o gradiente e o tubo para obtenção do plasma. Ambos contêm sangue.

Coloque o tubo contendo o gradiente e o sangue na caçamba da centrífuga (cuidado para não balançar o tubo). Balanceie o peso das caçambas da centrífuga usando a balança de 2 pratos, equilibrando com outro tubo de mesmo peso. Se estiver usando dois tubos com gradiente, compense com água na caçamba. Programe a centrífuga para 200 rcf(=g) ou 1300rpm(na centrífuga Hettich), 15 minutos.

Centrifugue também o tubo contendo os 2 mL (ou mais) de sangue para obtenção do plasma. Utilize as caçambas vazias do mesmo procedimento. É importante balancear as caçambas para estes tubos também.

Enquanto centrifuga:

Prepare o isopor (limpe com etanol antes de colocar no fluxo) com gelo picado, contendo:

HBSS 2Xsem Ca²⁺ e Mg²⁺ (no mínimo 10 mL independente do número de tubos de gradiente)

HBSS 1Xsem Ca²⁺ e Mg²⁺ (no mínimo 21 mL para cada tubo de gradiente)

Água milli-Q (no mínimo 10 mL independente do número de tubos de gradiente)

HBSS 1 X com Ca²⁺ e Mg²⁺ (no mínimo 2 mL para cada condição a ser testada - lembre-se do controle!)

Prepare o tampão de lise (no mínimo 200µL)

Ligue o banho a 37 °C (câmara úmida)

Após a centrifugação do tubo com gradiente, descarte a região amarela, correspondente ao plasma, e metade do gradiente de 60% ou 58% contendo mononucleares (descarte aproximadamente 10 mL, isto é, até perto da marca de 25mL no tubo). Troque a ponteira. Insira a nova ponteira até a região de interface entre 60% e 70% ou 58% e 70% recolhendo para tubos falcon de 15mL estéril, todo o gradiente restante (aproximadamente 14 mL) dividido em até dois falcons de 15mL com no máximo 7 mL do gradiente contendo células por tubo, tendo o máximo de cuidado para não contaminar demais com hemácias, sendo aconselhado sugar os últimos 2 cm de gradiente com uma pipeta P200. (Procedimento realizado no fluxo laminar)

- **Evite ao máximo a presença de hemácias na fração recolhida. Complete o volume (de cada falcon de 15 mL) para 14mL com HBSS 1X gelado (4°C), homogeneizando bem para diluir o percoll, porém lentamente para evitar ativação. (Procedimento realizado no fluxo laminar)**

Após a centrifugação do tubo para coleta do plasma, recolha o sobrenadante (plasma) com muito cuidado para não aspirar hemácias. Mantenha a ponteira o mais longe possível das hemácias. Coloque o plasma num eppendorf, identifique com o código do doador e congele a -80 °C. (Procedimento realizado no fluxo laminar)

Para gradiente em FALCON de 15mL :

São dois tubos a serem centrifugados: O tubo contendo o gradiente e o tubo para obtenção do plasma. Ambos contêm sangue.

Coloque o tubo contendo o gradiente e o sangue na caçamba da centrífuga (cuidado para não balançar o tubo). Balanceie o peso das caçambas da centrífuga usando a balança de 2 pratos, equilibrando com outro tubo de mesmo peso. Se estiver usando dois tubos com gradiente, compense com água na caçamba. Programe a centrífuga para 400 rcf ou 1800rpm (na centrífuga Hettich), 37minutos.

Centrifugue também o tubo contendo os 2 mL (ou mais) de sangue para obtenção do plasma. Utilize caçambas vazias do mesmo procedimento. É importante balancear as caçambas para estes tubos também.

Enquanto centrifuga:

Prepare o isopor (limpe com etanol antes de colocar no fluxo) com gelo picado, contendo:

HBSS 2Xsem Ca^{2+} e Mg^{2+} (no mínimo 10 mL independente do número de tubos de gradiente)

HBSS 1Xsem Ca^{2+} e Mg^{2+} (no mínimo 21 mL para cada tubo de gradiente)

Água milli-Q (no mínimo 10 mL independente do número de tubos de gradiente)

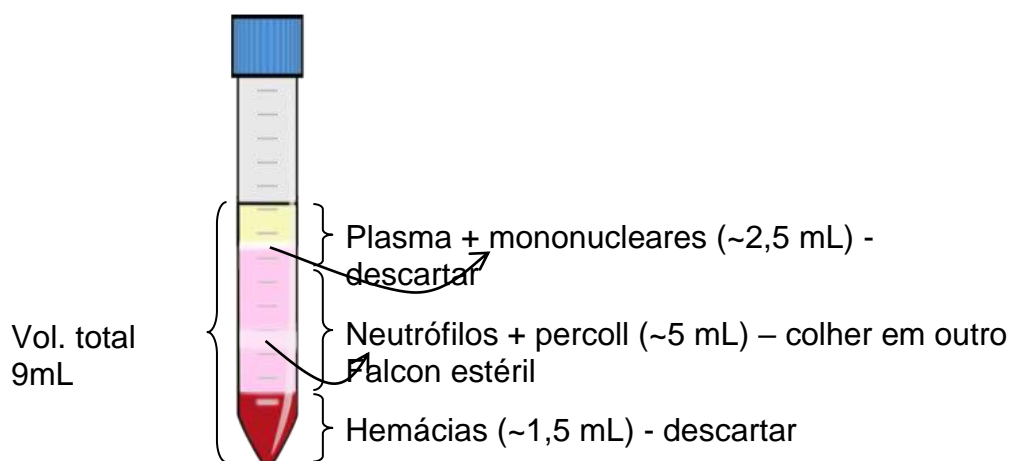
HBSS 1 X com Ca^{2+} e Mg^{2+} (no mínimo 2 mL para cada condição a ser testada - lembre-se do controle!)

Prepare o tampão de lise (no mínimo 200 μL)

Ligue o banho a 37 °C (câmara úmida)

Após centrifugar os tubos, coloque as 4 caçambas para gelar.

- **Após a centrifugação, descarte a região amarela, correspondente ao plasma, e metade do gradiente de 60% ou 58% contendo mononucleares (descarte aproximadamente 2,5 mL). Troque a ponteira. Insira a ponteira nova até a região de interface entre o gradiente mais denso e menos denso recolhendo toda a região esbranquiçada que corresponde aos neutrófilos (aproximadamente entre as marcas 3 - 5 do tubo falcon), transferindo para outro tubo falcon de 15mL estéril. Depois aspire todo o restante de gradiente mais células restantes, tendo cuidado para não sugar as hemácias que estão sedimentadas (Procedimento realizado no fluxo laminar).**



- **Evite ao máximo a presença de hemácias na fração recolhida.**
- **Não junte neutrófilos de tubos diferentes nesta etapa. Eles serão combinados imediatamente antes da hemólise. Se estiver usando mais que um tubo de sangue, use o mesmo número de tubos para coletar os neutrófilos após a centrifugação do gradiente. Ex: se tiver 2 tubos de gradiente na centrífuga, colete os neutrófilos em**

2 tubos separados, pois a lavagem com Percoll demanda um volume grande.

Lavagens com HBSS 1X

- *Complete o volume desses tubos falcon que receberam os neutrófilos para 14 mL com HBSS 1X gelado (no isopor com gelo), homogeneizando bem para diluir o Percoll, porém lentamente para evitar ativação. (Procedimento realizado no fluxo laminar)*

Centrifugue os tubos falcon de 15mL contendo neutrófilos no gradiente (já diluído na etapa anterior) por 5 min a 300rcf (ou 1600rpm na centrífuga Hettich), utilizando as caçambas geladas (4°C). Ao retirar um par de caçambas do freezer, lembre-se de colocar outro par para gelar (será usado na próxima centrifugação).

Enquanto centrifuga os tubos de lavagem para retirada do Percoll, prepare tubo do plasma: Recolha o sobrenadante (plasma) com muito cuidado para não aspirar hemácias. Mantenha a ponteira o mais longe possível das hemácias. Coloque o plasma num eppendorf, identifique com o código do doador e congele a -80 °C. (Procedimento realizado no fluxo laminar)

Descarte o sobrenadante vertendo lentamente o tubo e faça a segunda lavagem adicionando 7mL HBSS sem Ca²⁺ e Mg²⁺ 1x gelado (4°C) e homogeneizar com P1000 tomando o máximo de cuidado. (Procedimento realizado no fluxo laminar) (usa-se P1000, pois funciona melhor que inversão para ressuspender o pellet)

Centrifugue novamente por 5 min a 300rcf ou 1600rpm, utilizando as caçambas geladas (4°C). Ao retirar um par de caçambas do freezer, lembre-se de colocar outro par para gelar (será usado na próxima centrifugação, para hemólise).

Enquanto centrifuga, prepare as soluções de NBT (uma para cada condição)

Após esta centrifugação é visualizado o pellet (geralmente com contaminação por hemácias), portanto realiza-se a hemólise. Retira-se o sobrenadante vertendo (HBSS 1X + PERCOLL) e espera-se obter o pellet em aprox. 200 µL (esse deve ser o volume residual no tubo após verter). Se necessário, ajuste o volume para 200 µL com HBSS 1X sem cálcio e magnésio. (Procedimento realizado no fluxo laminar)

Se tiver preparado mais que um tubo, misture as preparações (de ~200 µL cada) em um único tubo antes de fazer a hemólise.

Obs: cuidado para não perder células na ponteira.

Hemólise

Nesta etapa é preciso ser muito ágil, portanto é necessário deixar as soluções já pipetadas em tubos no gelo: 2 tubos, cada um com 3 mL de HBSS 2X sem Ca^{2+} e Mg^{2+} e 2 tubos com 3 mL de água milli-Q estéril gelada cada um (manter todos esses tubos no gelo).OBS: volumes e quantidades para 1 tubo de neutrófilos lavados. Ajustar se houver mais tubos.

Adicione à suspensão de células (200µL obtidos ao final da lavagem) 3mL de água milli-Q estéril gelada, homogeneíze suavemente (com a mesma ponteira que usou para adicionar água) por 25 segundos e adicione 3mL de solução de HBSS 2X (já deixar pipetado em um tubo estéril a parte), para restaurar a osmolaridade. (Procedimento realizado no fluxo laminar)

Centrifugue por 5 min a 300rcf ou 1600rpm, com as caçambas e soluções geladas (4°C). Ao retirar um par de caçambas do freezer, lembre-se de colocar outro par para gelar (será usado na próxima centrifugação). Lembre-se também de colocar um tubo com ~6mL de água para balancear (neste ponto deve haver só um tubo com células, pois foram combinadas antes da hemólise).

Repita a lise e a centrifugação caso ainda verifique presença de hemácias sobre o pellet. Ao final das duas lises será obtido um pellet branco-amarelado, contendo apenas neutrófilos.

Observação: Caso se perceba uma grande contaminação com hemácias após a 1ª hemólise, pode-se tentar retirá-las ressuspensando somente as hemácias, fazendo uma homogeneização leve e retirando todo o sobrenadante. Posteriormente adicione 300 µL de HBSS 1X sem cálcio e magnésio e realize o procedimento de hemólise novamente. Mas cuidado porque este procedimento pode diminuir o rendimento. (Procedimento realizado no fluxo laminar)

Após as lises: (Procedimento realizado no fluxo laminar)

Descarte o sobrenadante;

Avalie o volume residual no tubo com pipeta P1000 (geralmente o volume residual será entre 200 e 300 µL;

Homogeneíze com a mesma P1000 de maneira suave porém eficiente e retire alíquotas para analisar a viabilidade, pureza e rendimento (descrito nas próximas etapas).

Mantenha esse estoque de células a 4 °C durante os preparos para microscopia.

Contagem de células, viabilidade e pureza

Rendimento da separação de células e viabilidade:

Homogeneíze com P200 e retire 5µL da suspensão de células preparada na etapa anterior (mantenha o falcon no gelo)e adicione a um eppendorf contendo 45 µL de solução de Azul de Tripán 0,2% (verifique se a

solução de tripan foi filtrada recentemente antes de usar). Homogeneíze bem e coloque 10 μ L em um dos lados da câmara de Neubauer até preencher um dos quadros de leitura (Fig. 1B). Focalizar com a objetiva de 40x e fazer a contagem do número de células nas quatro regiões L, conforme a figura.

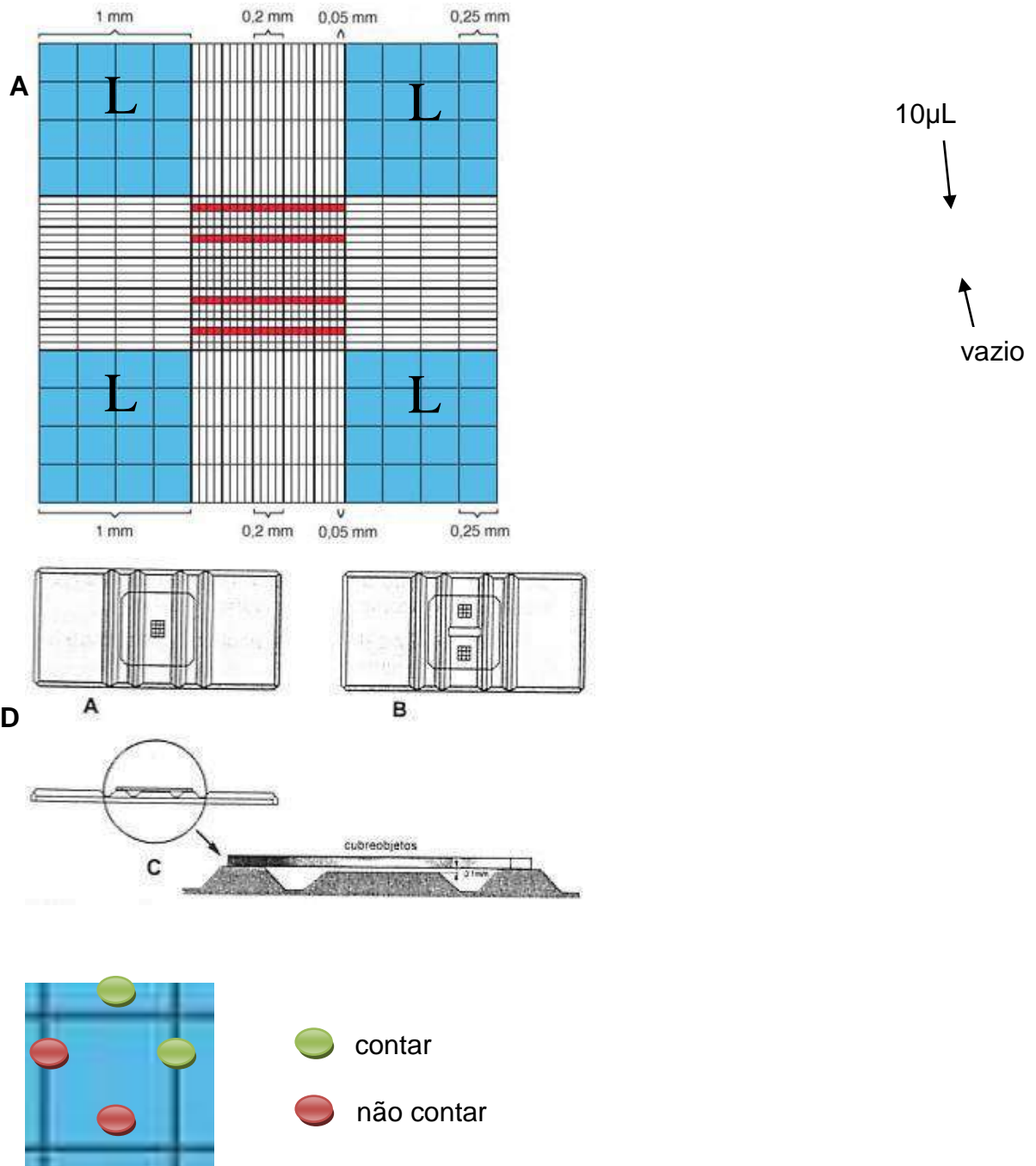


Fig.1 – Câmara de Neubauer. A: Ampliação de um quadro de leitura. As áreas L representam as regiões para contagem de neutrófilos. B: câmara com dois quadros de leitura, indicando a aplicação de 10 μ L em um dos quadros. C: perfil da câmara coberta por lamínula mostrando a altura de 0,1mm. D: ampliação de um quadrado contido na área L, indicando em que condições as células sobre as linhas devem ou não ser contadas.

Esta contagem deve ser feita rapidamente, pois os neutrófilos p/ os outros experimentos estão aguardando e podem se ativar por contato.

Contar como vivas as células com núcleo transparente e como mortas aquelas que apresentam o núcleo corado de azul escuro.

Se a célula estiver sobre a linha, entre um quadrado pequeno e outro, contar somente as que estão sobre as linhas superior ou direita. Não contar as que estão sobre as linhas inferior ou esquerda (assim evita-se contar uma mesma célula duas vezes), como na Figura 1D.

A área de cada quadrado L é de 1mm². A profundidade da câmara é de 0,1mm.

Logo ao contar quatro áreas L (para contagem de leucócitos), estamos contando o número de células em 0,4mm³, que corresponde ao número de células em 0,4 μ L. Então multiplica-se por 2,5 para saber o número de células por μ L na câmara.

Para facilitar os cálculos de contagem pode-se usar a planilha “cálculos soluções e células” no GoogleDrive:

<https://drive.google.com/open?id=1li8ksBUjzwwZTpZEVf7V9qjTHEZdh5UTnfOi0GvX-es>

Veja detalhes de como usar a planilha no final deste protocolo

Como as células da câmara vieram de uma diluição 1:10 (5 μ L células + 45 μ L tripan), é necessário multiplicar pelo fator de diluição de 10 vezes.

Cálculo: $2,5 \times 10 \times (L1+L2+L3+L4) = \text{número de células}/\mu\text{L}$ (na suspensão obtida ao final da lise)

Para saber o rendimento total (total de células no 1mL para o tubo de 50 ou no 0,5mL para o tubo de 15), é necessário multiplicar esse valor (número de células / μ L) pelo volume de 1000 ou 500 respectivamente.

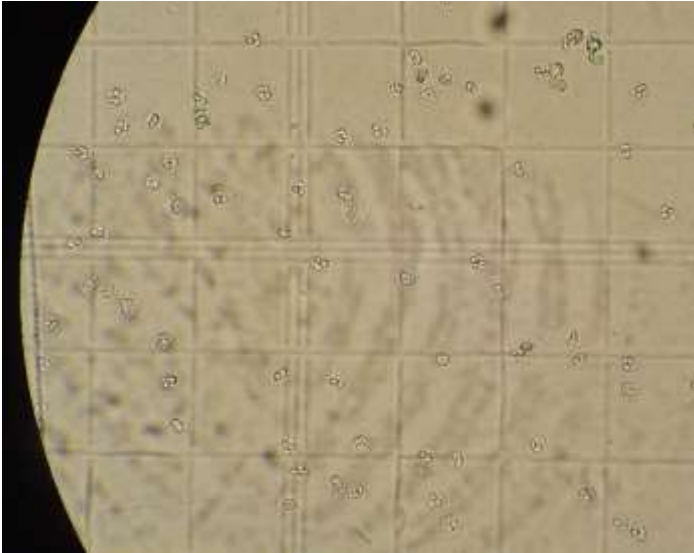
Verificar a porcentagem de células mortas e vivas.

Devem ser contadas todas as células presentes, sem tentar diferenciar neutrófilos das demais células. Essa diferenciação será feita na análise de pureza, utilizando outra coloração e aumento maior.

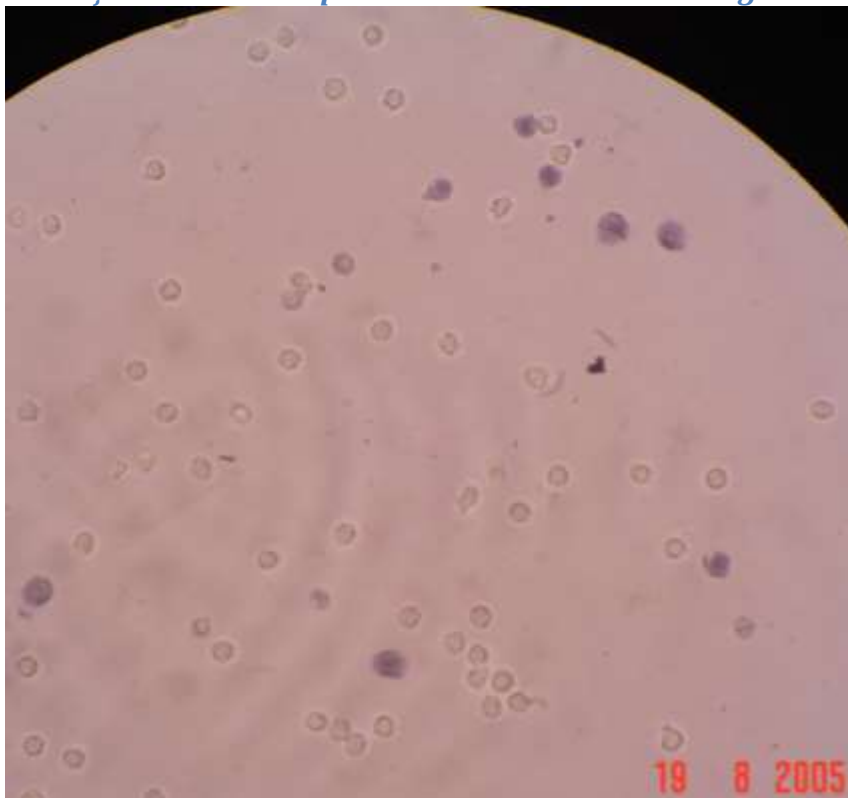
O ideal é que se obtenha, cerca de 10⁴ células / μ L (~7 células por quadrado pequeno dentro do L), a partir de 500 μ L de suspensão de células (obtidos a partir de separação em Falcon de 15), com viabilidade > 98%.

Observação: Caso se obtenha uma suspensão de células muito concentrada, a diluição em solução de Tripán deve ser maior, até que se veja no máximo 300 células por região L (~19 células em cada quadrado pequeno). Se a diluição for maior, o fator de diluição utilizado no cálculo deve ser ajustado.

Visualização dos neutrófilos na câmara de Neubauer:



Visualização ao microscópio de células coradas com nigrosina:



Pureza de células (coloração com panótico rápido):

Após realizar o experimento de contagem, pipete 3 alíquotas de 2 µL das células que estão no falcon (manter o falcon no gelo) em 3 posições separadas em uma lâmina previamente lavada (cuidado para remover bem o detergente ao lavar). Espalhe bem a gota para que seque rapidamente (porém com cuidado para não danificar as células, sem esfregar no vidro). Insira a lâmina na caçamba adaptadora de lâmina, coloque outra lâmina como contrapeso, espere secar um pouco (~ 2 min) e centrifugue na centrífuga da Hettich a 800 rpm por 10 minutos.



Enquanto centrifuga: Termine o preparo do NBT (com ativadores), termine o preparo do tampão de lise e faça os cálculos da concentração de células (ver tópico abaixo)

Retire a lâmina após a centrifugação e verifique se está bem seca. Se não estiver, espere secar.

**Mergulhe na solução 1 do corante panótico (triarilmetano a 0,1%):
5 imersões consecutivas de 1 segundo cada.**

Deixe escorrer bem sobre papel toalha.

**Mergulhe na solução 2 do corante panótico (xantenos a 0,1%):
6 imersões consecutivas de 1 segundo cada.**

Deixe escorrer sobre papel toalha.

**Mergulhe na solução 3 do corante panótico (tiazinas a 0,1%):
2 imersões consecutivas de 1 segundo cada.**

Deixe escorrer bem sobre papel toalha.

Lave com tampão pH 7 ou água destilada. Correr sobre a lâmina de forma suave para não remover as células.

Deixe escorrer na posição vertical até secar em temperatura ambiente.

Faça a contagem das células observando suas características morfológicas.

Conte 100 células em aumento de 100 x, usando óleo de imersão. Espera-se obter entre 95 e 98% de neutrófilos.

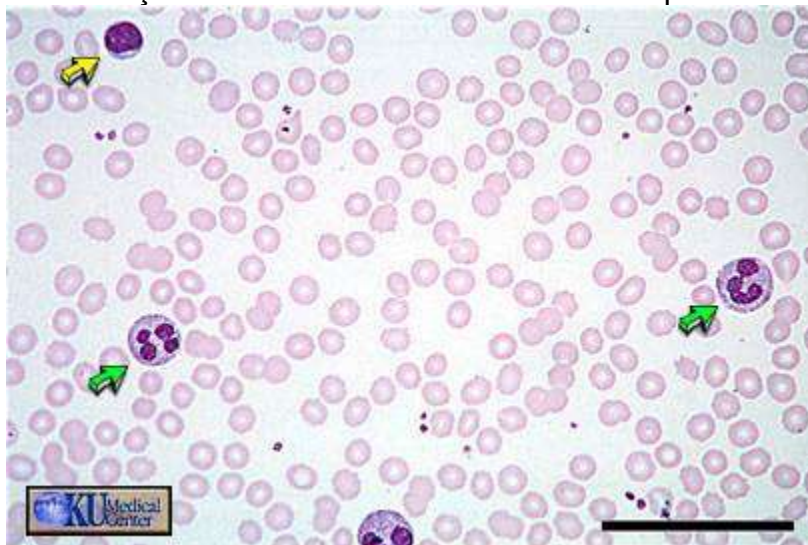
OBS: Tampar bem os frascos do corante panótico (principalmente o frasco 1) pois são voláteis. O principal contaminante é o eosinófilo, já que apresenta densidade muito semelhante à do neutrófilo. Porém, ele apresenta granulação mais grosseira e mais avermelhada. Linfócitos apresentam núcleo não lobulado, que ocupa quase toda a célula, são menores e com citoplasma mais azulado. Neutrófilos apresentam grânulos mais finos e núcleo segmentado. Nesta lâmina não se deve verificar a presença de hemácias (já que foram lisadas) e nem de plaquetas. Não se deve contar células lisadas, apenas células que se consegue identificar, sem ter dúvidas, quanto a morfologia.

Exemplo de uma lâmina de pureza



Presença de um eosinófilo no quadrante direito inferior.

Figura ilustrativa de um esfregaço sanguíneo apenas para mostrar um linfócito e a relação de tamanho entre os diferentes tipos celulares.



seta amarela = linfócito; setas verdes = neutrófilos; demais células = hemácias.

Preparo da suspensão de células para ativação

O procedimento de ativação é descrito em no **protocolo de ativação de neutrófilos**. Todos os experimentos terão a mesma concentração final de ativador e de células, para isso é preciso partir de estoques de células e ativadores e ajustar as concentrações. Esse procedimento se inicia a partir de

uma suspensão de células de concentração determinada. Essa concentração de células depende do ativador a ser utilizado, portanto a primeira etapa será verificar quais ativadores serão usados para que se saiba quais as concentrações de células a serem preparadas. A tabela abaixo mostra um resumo dessas concentrações. Para mais detalhes, veja o protocolo de ativação de neutrófilos.

Ativador único		Dois ativadores	
Ativador (Estoque)	Conc. inicial células (cel/ μ L)	Ativador (Estoque)	Conc. inicial células (cel/ μ L)
PAF (E2)	6667	PAF (E2)+ fMLP (E2)	6694
PMA (E2)	6667	LPS (3)+ TNF- α (E2)	6735
fMLP (E2)	6667		
LPS (E3)	6667		
TNF-alfa	6667		
IL-8			
TiO ₂	6667		

- A partir do cálculo realizado na contagem de células, calcule o volume de HBSS/plasma 50% a ser usado no preparo da suspensão de células;
- Se o seu experimento envolve condições que demandam diferentes concentrações iniciais de células, devem ser feitas alíquotas antes do ajuste de concentração (veja detalhes no protocolo de ativação)
- Dependendo do rendimento de células pode ser necessário aumentar ou diminuir o volume. Por exemplo, se o rendimento de sua separação de células foi baixo, você vai precisar centrifugar e retirar líquido para aumentar a concentração de células até o valor desejado. Se seu rendimento foi elevado, você precisará diluir mais para atingir a concentração desejada. A seguir, um exemplo de cada situação: (Procedimento realizado no fluxo laminar)
 - Use a equação $Vol = 486 - \frac{tot.céls}{6667}$
 - Onde Vol = volume a ser alterado (adicionado ou retirado da suspensão de células); tot.céls = total de células obtido na separação; 486 é o volume final da suspensão (500 μ L após a retirada de 14 para microscopia); 6667 é a concentração de células desejada

Exemplo 1 (necessário concentrar):

Ativador a ser usado = fMLP

Células obtidas = 3×10^6 células em 500 μ L

Concentração de células necessária (conforme tabela) = 6667 células/ μ L

6667 células ----- 1 μ L

3×10^6 células ----- x μ L -> x = 450 μ L

Temos as células em 486 μ L (500 μ L da suspensão original, após a hemólise, descontados os 14 μ L retirados para microscopia – 5+3+3+3), mas seria necessário ter em 450 μ L

Para isso é necessário centrifugar a 300 rcf ou 1600rpm por 5 minutos a 4 °C edescartar 36 µLdo sobrenadante. Depois ressuspenda as células no HBSS/plasma que restou no tubomisturando bem, porém suavemente.

Com a suspensão de 6667 células/µL, num volume total de 450 µL, passa-se ao protocolo de ativação.

Exemplo 2 (necessário diluir):

Ativador a ser usado = fMLP

Células obtidas = 5×10^6 células em 500 µL

Concentração de células necessária (conforme tabela) = 6667 células/µL

6667 células ----- 1 µL

5×10^6 células ----- x µL -> x = 750 µL

Temos as células em 486 µL (500 µL da suspensão original, após a hemólise, descontados os 14 µL retirados para microscopia – 5+3+3+3), mas seria necessário ter em 750 µL

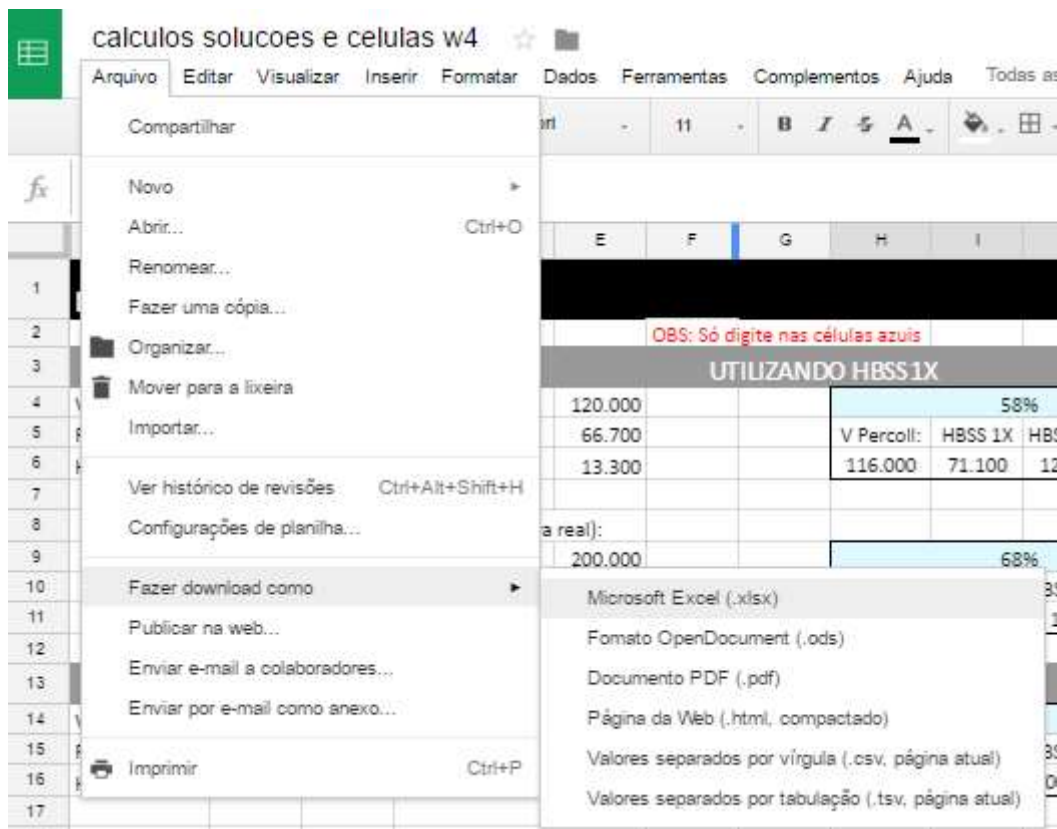
Para isso é necessário apenas adicionar 264 µLde plasma/HBSS e homogeneizar.

Com a suspensão de 6667 células/µL, num volume total de 750 µL, passa-se ao protocolo de ativação.

Como usar a Planilha

Orientações gerais

- Somente digite valores nas células azuis.
- Ao terminar de inserir os dados do seu experimento, faça download da planilha e guarde junto com seus resultados. Lembre-se de colocar o código da amostra no nome do arquivo depois do download.



Aba Percoll

- Verifique no protocolo quais porcentagens pretende usar e quais volumes pretende usar (dependendo de características do doador e do volume de sangue a se utilizar)
- (seta 1) Preencha a célula azul Volume Final com o volume de gradiente a ser usado (geralmente 3 ou 12 mL)
 - Os volumes na tabela são calculados em microlitros (3000 ou 12000 µL)
- Utilize o preparo a partir de Percoll, HBSS 10X e Água. A tabela que usa HBSS 1X (apesar de estar correta) não deve ser considerada e suas linhas estão ocultas na planilha.
 - (seta 2) Veja os volumes a serem usados na tabela da direita.

Preparing the Percoll solutions

Todos os volumes em microlitros

OBS: Só digite nas células azuis

UTILIZANDO ÁGUA											
Volume Final:	3000	Volume Percoll:	1800.000	58%				60%			
Percoll:	60%	Água	900.000	V Percoll:	Água	HBSS 10X	[HBSS]	V Percoll:	Água	HBSS 10X	[HBSS]
HBSS Final:	1 X	HBSS 10X	300.000	1740.000	960.000	300.000	1.00000	1800.000	900.000	300.000	1.00000
Testes (prova real):											
Vol Total:		3000.000		68%				70%			
[HBSS]		1.0000		V Percoll:	Água	HBSS 10X	[HBSS]	V Percoll:	Água	HBSS 10X	[HBSS]
				2040.000	660.000	300.000	1.00000	2100.000	600.000	300.000	1.00000

Aba cell counter

- Depois de verter o sobrenadante após a última hemólise, homogeneíze as células e meça o volume usando uma pipeta P1000.
 - O volume medido deve ser anotado na célula “Vol. total da suspensão de células=”
 - Anote também o volume retirado para colocar na Neubauer: “Vol de células retirado da suspensão (antes de adicionar tripan)=”
 - Depois anote o volume de tripan usado “Vol. de tripan adicionado às células=”
- Enquanto fizer a contagem, anote os números de células vivas e mortas em cada quadrado:

V = Número de células vivas no quadrado
M = Número de células mortas no quadrado

V	13	V	2	V	4	V	5
M	0	M	0	M	0	M	0
V	5	V		V		V	4
M	0	M	0	M	0	M	0

Red arrows point to the 'V' and 'M' columns with labels 'vivas' and 'mortas' respectively.

Aba cell concentration

- Anote o volume da alíquota retirada para fazer a lâmina de morfologia (panóptico).
- Nas células azuis em frente aos nomes dos ativadores, anote quantas condições de cada ativador serão feitas no seu experimento. Geralmente essas células são preenchidas apenas com zero (para ativadores que não serão usados) ou 1 (para ativadores que serão usados). Se for usar mais que uma condição para um determinado ativador, então coloque o número de condições usadas aqui. (ex: para testar dois tamanhos diferentes de partículas de titânio, coloque 2 na frente de TiO₂)

Ativador único				Ativadores múltiplos				
Ativador	conc. inicial de células desejada	Quantas condições deste ativador?	Vol. p/ cada condição	Ativador 1	Ativador 2	conc. inicial de células desejada	Quantas condições deste ativador?	Vol. p/ cada condição
PAF (E2)	6667	0	0.0	PAF(E2)	fMLP (E2)	6694	0	0.0
PMA (E2)	6667	0	0.0	fMLP (E2)	PAF(E2)	6694	0	0.0
fMLP (E2)	6667	0	0.0	LPS (E3)	TNF-a (E3)	6735	0	0.0
LPS (E3)	6667	1	55.5	TNF-a (E3)	LPS (E3)	6735	1	54.9
TNF-a (E2)	6667	1	55.5					
IL-8		0	0.0	NanoGel		7333		0.0
TiO ₂	6667	0	0.0					
Ctrl (HBSS)	6667	1	55.5					

Red arrows point to the 'Quantas condições deste ativador?' column in both the 'Ativador único' and 'Ativadores múltiplos' sections.

No exemplo da figura acima serão testadas 4 condições: LPS, TNF, LPS+TNF e controle, um teste de cada condição (por isso foram marcados com 1). Os ativadores que não serão usados foram marcados com zero.

- Verifique se o total de condições está de acordo com o planejado para seu experimento e corrija a marcação acima se não estiver.

TOTAL		4
-------	--	---

- Se o seu experimento usar condições que partem de concentrações iniciais de células diferentes, a planilha irá mostrar quantas alíquotas deve ser preparadas e qual o volume a se acrescentar ou retirar de cada alíquota.
 - Neste exemplo serão necessárias duas alíquotas, uma de 6667 células/ μL e outra de 6735 células/ μL , como na figura a seguir:

SUBTOTAL	6667	3	Alíquota 1
	6694	0	
	6735	1	Alíquota 2
	7333		

- Para dividir suas células nessas alíquotas, transfira o volume indicado em uma das células para outro eppendorf, como na figura a seguir:

			Alíquota do vol. células (uL)	
SUBTOTAL	6667	3	141.8	Transfira 141.8 uL para outro eppendorf
	6694	0	0.0	
	6735	1	47.3	Vão sobrar 47.3 uL no eppendorf original
	7333		0.0	

- Como as células ainda estão mais concentradas do que o desejável, será necessário diluir em HBSS/plasma (50% de plasma em HBSS 1X com Ca e Mg) como na figura a seguir:

			Alíquota do vol. células (uL)	Alíquota do no. células	vol. desejado	Vol. a acrescentar / retirar
SUBTOTAL	6667	3	141.8	1.11E+06	166.4	Acrescente 24.6 μL de HBSS/plasma a esta alíquota
	6694	0	0.0	0.00E+00	0.0	0.0
	6735	1	47.3	3.70E+05	54.9	Acrescente 7.6 μL de HBSS/plasma a esta alíquota
	7333		0.0	0.00E+00	0.0	

- A alíquota de 6667 células/ μ L atenderá a 3 condições diferentes, portanto ainda deve ser dividida. A planilha mostra o volume a ser transferido para cada tubo, como na figura a seguir:

A alíquota de 166.4 uL será dividida em 3 tubos, retirando-se 55.5 uL duas vezes e deixando a terceira alíquota no tubo original.	A alíquota de 54.9 uL já está pronta no tubo original.
---	--

Ativador único				Ativadores múltiplos				
Ativador	conc. inicial de células desejada	Quantas condições deste ativador?	Vol. p/ cada condição	Ativador 1	Ativador 2	conc. inicial de células desejada	Quantas condições deste ativador?	Vol. p/ cada condição
PAF (E2)	6667	0	0.0	PAF(E2)	fMLP (E2)	6694	0	0.0
PMA (E2)	6667	0	0.0	fMLP (E2)	PAF(E2)	6694	0	0.0
fMLP (E2)	6667	0	0.0	LPS (E3)	TNF-a (E3)	6735	0	0.0
LPS (E3)	6667	1	55.5	TNF-a (E3)	LPS (E3)	6735	1	54.9
TNF-a (E2)	6667	1	55.5					
IL-8		0	0.0	NanoGel		7333		0.0
TiO2	6667	0	0.0					
Ctrl (HBSS)	6667	1	55.5					

As outras abas da planilha são comentadas no protocolo de ativação

Soluções

Preparo da solução de Turk:

2mL ácido acético glacial

1mL de violeta de genciana 1% ou 1mL de azul de metileno 1%

93mL de água destilada.

Filtrar para se eliminar microrganismos

Preparo da solução de Tripan 1X (0,2%)

Pipetar 1 ml de Turk e 3 ml de HBSS sem cálcio e magnésio em um eppendorf

Dissolver 8 mg de azul de tripan nos 4 mL da solução descrita acima

Preparo da solução de hipoclorito 0,2%: (solução descontaminante)

Um volume de água sanitária 2% (esta é a concentração já na garrafa)

Nove volumes de água

Preparo da solução de HBSS (caso tenha que preparar, pois normalmente usamos o pronto):

	HBSS 10X	HBSS 1X Concentrações
Cloreto de Potássio	0,2g	0,4g/L
Fosfato de Potássio monobásico	0,03g	0,06g/L
NaCl	4g	8g/L
Fosfato de Sódio dibásico	0,024g	0,048g/L
D-glicose	0,5g	1g/L
Vermelho de Fenol	5,5mg	11mg/L
Bicarbonato de Sódio	0,175g	0,35g/L
Água milli Q	Qsp 50 mL	Qsp 1L

Adicionar por último o vermelho de fenol, após certificar-se que todos os sais já foram solubilizados. Em seguida acertar o pH para 7.40 (faixa aceitável entre 7,35 – 7,45).

Para preparar o HBSS 1X a partir do HBSS 10X, adicionar 5 mL do HBSS 10X a um tubo falcon (estéril) de 50 mL e completar o volume com 45 mL de água milli-Q estéril.

Preparo da solução de PBS

Reagentes	Quantidades
NaH ₂ PO ₄ (1,9 mM)	0,23g
Na ₂ HPO ₄ (8,1mM)	1,15g
NaCl (154 mM)	9g
H ₂ O	900 mL

Adicionar todos os reagentes para um volume final de 1L e ajustar o pH entre 7,2 a 7,3, estocar em geladeira a 4°C.

Para o PBS contendo cálcio e magnésio é adicionado: 0,9 mM (0,0998 g/L) de CaCl₂ e 0,5 mM (0,0476 g/L) de MgCl₂.