



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

Roberto Vieira Resende

**CÉLULAS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS
EM CONTATO COM TITÂNIO E ZIRCÔNIA**

Tese

Brasília, 2024



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

CÉLULAS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS EM CONTATO COM TITÂNIO E ZIRCÔNIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da UnB como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Linha de Pesquisa: Imunologia aplicada

Brasília, 2024

Folha de Aprovação

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Daniela Franco Bueno, PhD
Presidente da Banca

Dra. Núbia Maria Pereira, PhD
Secretaria de Saúde - DF

Prof. Dr. Marcus Teixeira, PhD
Universidade de Brasília - DF

Prof. Dr. José Ricardo Muniz Ferreira, PhD
R-Crio, Campinas - SP

Prof. Dr. Carlos Henrique Guimarães Jr., PhD
Brasília - DF

Dedico este trabalho a meus pais,

Altamir Resende e Cajuby Vieira Resende, meus primeiros mestres.



Fig. i – Minha mãe comigo, recém-nascido.

E também a D. Mariângela, que me ensinou a ler;
D. Marlene, que despertou meu interesse por Ciências;
D. Nenzinha, que sabe que me formei em Odontologia;
D. Zuleima Alves Scarpin de Carvalho, minha professora do 4º ano;
D. Maria Stella Gonçalves Marques, Diretora do Grupo Escolar Santos Dumont, do humilde bairro de Venda Nova, em Belo Horizonte.
D. Edir, a temida disciplinadora.

A

Profa. Dra. Amélia Dulce Villela de Carvalho, minha mãe científica; e
Cybéle Aires Machado, que me ensinou as técnicas histológicas e
histoquímicas,

Vocês constituem o firme alicerce que sustenta minha jornada.

Agradecimentos

Agradeço ao meu primeiro orientador, prof. Dr. José Raimundo Corrêa, por haver me aceito no doutorado, por todo o apoio nesta jornada, e pela confiança em minha capacidade;

À profa. Daniela Bueno por, aos 47 minutos do Segundo Tempo, ter conseguido salvar meu doutora, disponibilizando condições necessárias para a finalização dos experimentos que faltavam. Me ofereceu amizade, apoio e orientação segura. Permitiu um final à minha história.

Ao Dr. Daniel Navarro, por propiciar acesso ao laboratório do R-Crio, seus reagentes e estoque de células mesenquimais de polpa dental criopreservadas.

À profa. Daniela Oliveira, da Morfologia-UnB, por me fornecer as células mesenquimais lipoaspiradas e meio de cultivo;

À profa. Sônia Bão, por me permitir o uso da Sala de Cultivo (mesmo contrariando o pedido de suas alunas, em sentido contrário), e por fornecer as condições necessárias;

Ao dr. Johan, da *Zircon Vision*, da Bavária, Alemanha, por fornecer os discos de zircônia para o experimento;

Ao dr. Paulo, da *Peclab*, de Belo Horizonte, por fornecer os discos de titânio para o experimento;

Ao colega Anderson, da indústria *Consist* por fornecer as barras de titânio para os experimentos-piloto;

Ao Edimar, do Laboratório *Proceram*, por fornecer a zircônia para os experimentos-piloto, e fazer a sinterização em forno especial;

À Ingrid, técnica do LMM-IB-UnB, pela ajuda em todos os momentos;

À Lisseth, bacteriologista, por todo o apoio, companheirismo e consultoria nas técnicas de cultivo monocamada. Uma das poucas amigas que consegui fazer na UnB;

À Núbia, colega desde o mestrado, por demonstrar as técnicas de cultivo celular, e compartilhar comigo seus protocolos;

Às colegas de laboratório, por me oferecer obstáculos, sem os quais e não teria realizado cursos em outros estados – em laboratórios de excelência – nem estabelecido parcerias valiosas com outros laboratórios de excelência e pesquisadores renomados;

Aos professores da UnB, pela capacidade e dedicação à formação de pessoas;

Aos funcionários da UnB, da Biblioteca, do Restaurante Universitário e da Limpeza, pela dedicação e manutenção de tudo em perfeita ordem, para o desfrute dos alunos.

À CAPES, pela Bolsa de Pós-graduação e pelo acesso aos periódicos nacionais e internacionais.

E, muito especialmente, ao prof. Guilherme Martins Santos, coordenador da Patomol e ao prof. Marcus Teixeira, presidente da Banca de Qualificação, por entenderem todos os problemas e atrasos advindos da epidemia de Covid-19 e seus desdobramentos. Sem seu auxílio, não conseguiríamos chegar à Defesa final. Ainda, um agradecimento especial aos membros da Banca Examinadora, pelo tempo dedicado em ler, rever, examinar detalhes para contribuir com o aperfeiçoamento desta Tese e, por conseguinte, para o melhor fechamento possível desta pós-graduação.

Serei eternamente grato a vocês !

Epígrafe

“O Círculo é um Triângulo que não tem pontas”

(profeta do RU)

I Ching

03 - O Começo

 **Água**
Trovão

O Oráculo

*Dificuldade inicial seguida de sublime sucesso.
A perseverança na direção correta traz recompensas.
Não procure novos objetivos.
É vantajoso consolidar a posição atual.*

O conselho estratégico

O homem nobre se ocupa em colocar as coisas em ordem.

Fig. ii - Hexagrama 03 do I Ching , disponível em: <https://iching.com.br/consulte-o-i-ching-online/>

Resumo (em português)

Os implantes de titânio têm longa história de sucesso, substituindo dentes e articulações ósseas. Há poucos anos, foram introduzidos os implantes de zircônia. A fim de estudar a interação de células mesenquimais indiferenciadas se transformando em osteoblastos e promovendo a osteointegração, foram conduzidos 3 experimentos: Inicialmente as amostras de titânio e zircônia foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura. Então, células mesenquimais de polpa dental humana foram colocadas em meios de cultivo com extratos de discos de titânio e zircônia, para ensaio *in vitro* de Viabilidade Celular pelo método de citotoxicidade indireta por WST-1, e em meio de diferenciação osteoblástica (HM), para o ensaio *in vitro* de Osteoindução a distância, aferida por Vermelho de Alizarina. O ensaio *in vitro* de Osteoindução por contato utilizou células mesenquimais indiferenciadas de lipoaspirado humano cultivadas em meio DMEM-*low* glucose sobre os 3 diferentes discos. Os discos de titânio e zircônia não afetaram o crescimento celular, indicando baixa toxicidade frente às células. O corante vermelho de alizarina identificou diferenciação osteoblástica tanto aos 7 como 14 dias de cultivo. O simples contato entre células mesenquimais de lipoaspirado cultivadas em DMEM-*low* não foi suficiente para desencadear a secreção óssea sobre os discos. Foi evidenciado que as superfícies de titânio e zircônia não são tóxicas às células mesenquimais indiferenciadas e os extratos de Titânio e Zircônia possuem propriedades que favorecem a diferenciação celular em direção a um fenótipo osteogênico.

Palavras-chave: Implantes dentais , titânio , zircônia, células mesenquimais, engenharia de tecidos, bioengenharia.

Abstract (in English)

INDIFFERENTIATED MESENCHYMAL CELLS IN CONTACT WITH TITANIUM AND ZIRCONIA

Titanium implants have a long history of success in replacing teeth and bone joints. A few years ago, zirconia implants were introduced. To study the interaction of undifferentiated mesenchymal cells transforming into osteoblasts and promoting osseointegration, three experiments were conducted: Initially, titanium and zirconia samples were characterized by Scanning Electron Microscopy. Then, human dental pulp mesenchymal cells were placed in contact with extracts from titanium and zirconia discs for *in vitro* cell viability assay by indirect cytotoxicity method WST-1 , and placed in osteoblastic differentiation medium (HM) for *in vitro* osteoinduction assay at a distance. The *in vitro* osteoinduction assay by contact used undifferentiated mesenchymal cells from human lipoaspirate cultured in DMEM-low glucose medium on the three different discs. Titanium and zirconia discs did not affect cell growth, indicating low toxicity to cells. Alizarin red staining identified osteoblastic differentiation at both 7 and 14 days of culture. Simple contact between mesenchymal cells from lipoaspirate cultured in DMEM-low did not trigger bone secretion onto the discs. It was evidenced that titanium and zirconia surfaces are not toxic to undifferentiated mesenchymal cells and titanium and zirconia extracts possess properties that favor cellular differentiation towards an osteogenic phenotype.

Key-words:

Dental implants , Titanium , Zirconia , Mesenchymal Cells , Bioengineering, Tissue Engineering

Resumo (en Esperanto)

Titanaj implantoj havas longan historion de sukceso en la anstataŭigo de dentoj kaj ostaj artikoj. Antaŭ kelkaj jaroj, oni enkondukis zirkonajn implantojn. Por studi la interagon de nediferencitaj mezenkimaj ĉeloj transformiĝantaj en osteoblastojn kaj promocii ostointegrigon, oni faris tri eksperimentojn: Unue, titanaj kaj zirkonaj specimenoj estis karakterizitaj per Skananta Elektronika Mikroskopio. Poste, homaj dentopulpaj mezenkimaj ĉeloj estis metitaj en kontakton kun titanaj kaj zirkonaj diskoj por *in vitro* ĉelviveco-ekzameno per ne rekta citotokseco-metodo WST-1, kaj en ostoblastan diferencigan medion (HM) por *in vitro* ostoindukto-ekzameno je distanco. La *in vitro* ostoindukto-ekzameno per kontakto uzis nediferencitajn mezenkimajn ĉelojn de homa lipoaspirado kultivitajn en DMEM-malalta glukoz-medio sur la tri malsamaj diskoj. Titanaj kaj zirkonaj diskoj ne influis ĉelan kreskon, indikante malaltan toksikecon al ĉeloj. Alizarin-ruĝa kolorigo identigis ostoblastan diferencigon ambaŭ ĉe 7 kaj 14 tagoj de kultivo. La simpla kontakto inter mezenkimaj ĉeloj de lipoaspirado kultivitaj en DMEM-*low* ne sufiĉis por ekigi ostajn sekreciojn sur la diskojn. Oni evidentigis, ke titanaj kaj zirkonaj surfacoj ne estas toksaj al nediferencitaj mezenkimaj ĉeloj kaj titanaj kaj zirkonaj ekstraktoj posedas proprecojn, kiuj favoras ĉelan diferencigon al ostogeza fenotipo.

Ŝlosilo-vortoj:

Dentaj implantoj, titano, zirkonio, mezenkimaj ĉeloj, histoenĝenierarto, bioenĝenierarto.

Resumen (en español)

Los implantes de titanio tienen una larga historia de éxito en reemplazar dientes y articulaciones óseas. Hace pocos años, se introdujeron los implantes de zirconia. Para estudiar la interacción de células mesenquimales indiferenciadas que se transforman en osteoblastos y promueven la osteointegración, se realizaron tres experimentos: Inicialmente, las muestras de titanio y zirconia se caracterizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Después, las células mesenquimales de pulpa dental humana se pusieron en contacto con discos de titanio y zirconia para ensayo *in vitro* de viabilidad celular por método de citotoxicidad indirecta WST-1 , y en medios de cultivo de diferenciación osteoblástica (HM) para ensayo *in vitro* de osteoinducción a distancia. El ensayo *in vitro* de osteoinducción por contacto utilizó células mesenquimales indiferenciadas de lipoaspirado humano cultivadas en medio DMEM-low glucose sobre los tres discos diferentes. Los discos de titanio y zirconia no afectaron el crecimiento celular, indicando baja toxicidad frente a las células. La tinción con rojo de alizarina identificó diferenciación osteoblástica tanto a los 7 como a los 14 días de cultivo. El simple contacto entre células mesenquimales de lipoaspirado cultivadas en DMEM-low no fue suficiente para desencadenar la secreción ósea sobre los discos. Se evidenció que las superficies de titanio y zirconia no son tóxicas a las células mesenquimales indiferenciadas y los extractos de titanio y zirconia poseen propiedades que favorecen la diferenciación celular hacia un fenotipo osteogénico.

Palabras-llave:

Implantes dentales, titanio, zirconia, células mesenquimales, ingeniería de tejidos, bioingeniería.

Lista de ilustrações

Fig. i - Minha mãe e eu, recém-nascido	p. iv
Fig. ii - Hexagrama 03 do I Ching, O começo	p. vi
Fig. 1 - Tendência atual para implantes	p. 9
Fig. 2 - Superfícies de implantes de zircônia	p. 11
Fig. 3 - Tabela periódica	p. 15
Fig. 4 - Implantes de dentes e articulações	p. 18
Fig. 5 - Neutrófilos ativados sobre titânio	p. 25
Fig. 6 - Dente com polpa dental	p. 27
Fig. 7 - Dentes cisos extraídos	p. 28
Fig. 8 - Osteoblasto	p. 29
Fig. 9 - Osteoblasto e espícula óssea	p. 31
Fig. 10 - Gráfico de tempo de cultivo celular	p. 32
Fig. 11 - Osteocalcina	p. 11
Fig. 12 - Histomorfometria óssea	p. 33
Fig. 13 - Osteonectina	p. 35
Fig. 14 - Osteopontina	p. 36
Fig. 15 - Osteoclasto	p. 37
Fig. 16 - Osteon	p. 37
Fig. 17 - Frasco com células de polpa dental	p. 42
Fig. 18 - Confocal - células de polpa	p. 42
Fig. 19 - Dentes terceiros molares extraídos	p. 43
Fig. 20 - Vermelho de Alizarina	p. 44
Fig. 21 - Frasco de WST-1	p. 45
Fig. 22 - Espectrofotômetro	p. 49
Fig. 23 - Ensaio I	p. 50
Fig. 24 - Ensaio II	p. 51
Fig. 25 - Ensaio III	p. 54

Fig. 26 - Extração - cultivo	p. 56
Fig. 27 - Tripsinização	p. 56
Fig. 28 - Células em meio de cultivo	p. 56
Fig. 29 - Células fusiformes	p. 57
Fig. 30 - Placa de cultivo celular	p. 57
Fig. 31 - Células em placa de 96 poços	p. 58
Fig. 32 - MEV - Titânio - 500 x	p. 59
Fig. 33 - MEV - Titânio - 1500 x	p. 59
Fig. 34 - EDS - Titânio	p. 59
Fig. 35 - MEV - Zircônia tratada - 500 x	p. 60
Fig. 36 - MEV - Zircônia tratada - 1500 x	p. 60
Fig. 37 - MEV - Zircônia N - 500 x	p. 61
Fig. 38 - MEV - Zircônia N - 1500 x	p. 61
Fig. 39 - EDS - Zircônia	p. 61
Fig. 40 - EDS - Zircônia S	p. 62
Fig. 41 - Viabilidade celular - 24 e 48h.	p. 63
Fig. 42 - Osteoindução - controle	p. 65
Fig. 43 - Prancha - Resultados Osteoindução	p. 66
Fig. 44 - Diferenciação celular - 14 d.	p. 66
Fig. 45 - Células em frasco de cultivo	p. 67
Fig. 46 - Sobrenadante (extratos) p/ congelamento	p. 78
Fig. 47 - MEV - Ti - osteoindução	p. 68
Fig. 48 - MEV - Zr - osteoindução	p. 68
Fig. 49 - MEV - controle negativo	p. 69

Lista de tabelas

Tab. 1 - Componentes das ligas de titânio	p. 14
Tab. 2 - Titânio e Zircônio na tabela periódica	p. 16
Tab. 3 - Óxido de zircônio	p. 20
Tab. 4 - Sub-populações de neutrófilos	p. 23

Lista de abreviaturas e siglas

- ° C - Graus Celsius
- ADN - Ácido DesoxirriboNucleico
- ARN - Ácido RiboNucleico
- ARNm- Ácido ribonucleico mensageiro
- ATZ - Zircônia Tratada com Alumina
- CC - Creative Commons = Domínio público, uso livre para fim não comercial
- DPSC - Células-tronco da polpa dentária humana
- ISCT - Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*)
- HM - meio de cultura Human Mesenchymal Expansion Medium (Millipore - Merck)
- kDa - kiloDalton
- rpm - rotações por minuto
- TGF- β - Fator Transformador de Crescimento- β = Fator β de Transformação e Crescimento
- Ti - Titânio
- TiO₂ - Óxido de Titânio
- TZP - Zircônia Policristalina Tetragonal
- WST-1 - Reagente para ensaios de viabilidade e citotoxicidade
- Y-TZP - Zircônia Policristalina Tetragonal estabilizada com Ítrio (Y)
- Zr - Zircônio
- ZrO₂ - Óxido de Zircônio = Zircônia

Sumário

Folha de Aprovação	<i>ii</i>
Dedicatória	<i>iii</i>
Agradecimentos	<i>iv</i>
Epígrafe	<i>v</i>
Resumo (em português)	<i>vi</i>
Abstract (in English)	<i>vii</i>
Resumo (en Esperanto)	<i>viii</i>
Resumen (en español)	<i>ix</i>
Lista de ilustrações	<i>x</i>
Lista de tabelas	<i>xii</i>
Lista de abreviaturas e siglas	<i>xiii</i>
Sumário	<i>xiv</i>
Introdução	p. 1
Implantes	p. 4
Osteointegração	p. 5
Titânio	p. 13
Zircônia	p. 16
Neutrófilo	p. 23
Células pluripotentes (multipotentes)	p. 25
Cels. Mesenquimais	p. 26
Cels. de Polpa Dental	p. 27
Osso	p. 29
Justificativa	p. 39
Objetivos	p. 40
Gerais	p. 40
Específicos	p. 40
Materiais e Métodos	p. 41
Desenho experimental	p. 41

Substratos	p. 42
Células	p. 42
Reagentes	p. 44
Microscopia Eletrônica de Varredura	p. 47
Ensaio biológico	p. 48
Viabilidade Celular - WST-1	p. 48
Osteoindução a distância	p. 51
Osteoindução por contato	p. 53
Resultados	p. 59
Microscopia eletrônica	p. 59
Viabilidade Celular	p. 62
Osteoindução a distância	p. 64
Osteoindução por contato	p. 67
Discussão	p. 70
Conclusões	p. 73
Perspectivas futuras	p. 74
Referências	p. 75
Apêndices A, B, C	p. 80
Anexos I, II, III	p. 88

1. INTRODUÇÃO

Há milênios, o ser humano tenta reparar a perda de dentes e de outros órgãos (GRANJEIRO, 2011), com o objetivo de reconstruir seu corpo e seu aparelho estômato-gnático (RESENDE, 2002), este último para restabelecer 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. 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 nível de sucesso de 96,4% (num período de 10 anos) e está muito bem documentado. O titânio é considerado o material de escolha para implantes, pela excelente biocompatibilidade e características mecânicas (ALTUNA, 2016; LEE, 2013; OSMAN, 2015; BORGES, 2020). Em odontologia, os implantes dentários têm uma longa história (OZKURT, 2011; SAITO, 2014; OSMAN, 2015), mas devido a potenciais comprometimentos estéticos (quando a transparência da gengiva deixa ver a cor metálica do implante), imunológicos e corrosão, estão sendo desenvolvidas novas tecnologias (com coloração mais favorável) como alternativas a esses implantes de metal (OZKURT, 2011; LEE, 2013; 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)(LEE, 2013), boa adesão do tecido gengival, com suas altas taxas de sucesso (ALTUNA, 2016), acima de 95% (KIRMANIDOU, 2016; BORGES, 2020). Apesar do reconhecido sucesso do titânio, novas ligas de Titânio 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. Segundo Lee e cols. (2013), a zircônia tem alta resistência elástica (~1200 MPa), condutividade térmica mínima, alto módulo de elasticidade (~200 GPa), além

de menor adesão bacteriana que o titânio. 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, reconhecidos como o padrão ouro para a substituição de dentes na odontologia de implantes (OZKURT, 2011; LEE, 2013; ALTUNA, 2016; BORGES, 2020; CHOPRA, 2024).

Durante a instalação, hemácias e plaquetas chegam logo à superfície dos implantes, mas não interagem com esses. Já os neutrófilos interagem fortemente com o titânio (SILVA, VC, 2011) e também com a zircônia (RESENDE, 2017). 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.

A osteointegração tem início com a adsorção de íons, proteínas, proteoglicanos, polissacarídeos pela camada de óxido de titânio. Logo após, macrófagos, neutrófilos e células osteoprogenitoras migram para a interface osso-implante se diferenciam em osteoblastos, e fazem aposição de tecido mineralizado (KIRMANIDOU, 2016; OUGHLIS, 2012; CHOPRA, 2024).

A falta de volume ósseo adequado é um grande problema na cirurgia de colocação de implantes (MUSTAPHA, 2017). Uma das técnicas para superar a falta de volume ósseo adequado é a utilização de células mesenquimais indiferenciadas (MUSTAPHA, 2017).

Quanto mais bem posicionados os implantes, com relação a localização e inclinação, tanto mais altas são as taxas de sucesso. Então, o volume ósseo que possibilite esse posicionamento ideal é um dos fatores primordiais na prática odontológica com implantes, como salienta Mustapha (2017).

Fatores sistêmicos (diabetes, osteoporose, deficiência de vitamina D) e fatores locais (periodontite, cistos, tumores, extrações prévias) podem alterar a arquitetura e consistência ósseas. E, assim, comprometer o sucesso a longo prazo dos implantes (MUSTAPHA, 2017; CHOPRA, 2024).

O primeiro isolamento de Células-tronco Mesenquimais de medula óssea foi publicado por Friedenstein, em 1968. A definição atual de Células-Tronco Mesenquimais refere-se a células não derivadas de progenitores hematopoiéticos que podem se diferenciar em células

mesodérmicas como adipócitos, condrócitos, miócitos, indo dar origem a tecido adiposo, cartilaginoso, ósseo, muscular, dependendo de fatores e estímulos internos e externos (MUSTAPHA, 2017).

Medula óssea, sangue periférico, tecido adiposo, músculo, cavidade sinovial, dentes (polpa e ligamento periodontal) são as fontes de células-tronco mesenquimais humanas (MUSTAPHA, 2017). Estudos têm demonstrado um resultado superior, quando as células-tronco mesenquimais são colhidas de periósteo (ZHU, 2006 *apud* MUSTAPHA, 2017) Expressão de antígenos de superfície permitem uma rápida caracterização das células mesenquimais indiferenciadas, o que pode ser estudado por ensaios imunocitoquímicos e por citometria de fluxo, podendo ser essas células isoladas por imunofluorescência, se o citômetro tiver “*sorter*” (MUSTAPHA, 2017).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*) assim define as células mesenquimais indiferenciadas:

- Devem aderir à superfície plástica dos frascos de cultivo;
- Quanto à positividade, ter expressão para CD105, CD73 e CD90 ;
- Quanto à negatividade, não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a , ou moléculas de superfície (HLA-DR) de leucócitos humanos e CD19;
- Devem se transformar, *in vitro*, em osteoblastos, condroblastos e adipócitos.

É importante salientar que esses critérios vêm sofrendo atualizações constantes, com o progresso das pesquisas (MUSTAPHA, 2017). Lee et al. (2013) demonstraram ser ausentes em humanos: CD14, CD31, CD34, CD45, CD49d, CD49f, CD51, CD54, CD71, CD106, CD133, complexo MHC II, citoqueratina, e desmina (MUSTAPHA, 2017). E, ainda, os últimos marcadores identificáveis para células mesenquimais indiferenciadas humanas: STRO-1, CD271, CD200, gangliosida GD2, e fosfatase alcalina tecidual não específica *frizzled-9* (MUSTAPHA, 2017).

As principais Fontes Doadoras de Células Mesenquimais Indiferenciadas são:

Medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, periósteo, pericênneto, polpa dental de dentes decíduos e de 3^{os} molares recém erupcionados (PRATHEESH, 2012; MUSTAPHA, 2017).

1.1 Implantes Dentais

Raízes artificiais metálicas ou de material cerâmico usadas para substituir dentes perdidos são chamadas de implantes dentais.

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 no corpo humano. 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

São materiais inorgânicos, não metálicos. Por exemplo: Alumina, Hidroxiapatita, Tricálcio-fosfato, Carbono, Carbono-Silício, Zircônia (ZrO_2), Alumina reforçada com Zircônia (ZTA) (OSMAN, 2015).

❖ Polímeros

Polímeros são substâncias composta por moléculas muito grandes, formadas pela união de moléculas menores (monômeros) através de ligações químicas. Em odontologia: Polimetilmetacrilato (PMMA), Politetrafluoretileno (PTFE), e outros (OSMAN, 2015).

1.2 Osteointegração

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 x 10⁶/mm³ 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 x 10³/mm³ 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 osteo-integração, 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. Por isso, em nossa dissertação demonstrou-se a interação de neutrófilos com superfícies de titânio e zircônia (RESENDE, 2017).

Para que haja a Osteointegração, é necessário que a superfície do implante seja povoada por células mesenquimais indiferenciadas e que estas se diferenciem em osteoblastos (OLIVARES-NAVARRETE, 2010). Estes têm que aderir à superfície, e secretar material mineralizado (STIEHLER, 2008). Ainda, recentes estudos sugerem que até o alinhamento dos osteoblastos desempenham papel importante na formação óssea e resistência dos implantes às cargas mastigatórias. Esse alinhamento pode ser dirigido por nanotexturização da superfície dos implantes (CHOPRA, 2024).

Porém, todo o fenômeno da osteointegração tem início com a adsorção de íon, proteínas, proteoglicanos, polissacarídeos pela camada de óxido de titânio, no momento da implantação. Finalmente, macrófagos, neutrófilos e células osteoprogenitoras migram para a interface osso-implante e fazem aposição de tecido mineralizado (KIRMANIDOU, 2016, GULATI, 2023; CHOPRA, 2024). Índices médios de contato osso-implante superiores a 60% correspondem a osteointegração de ótima qualidade (OSMAN, 2015), mas a nanotecnologia de texturização superficial por anodização eletroquímica promove uma maior adesão de proteínas, e orientação, adesão e espalhamento dos osteoblastos (CHOPRA, 2024), devendo melhorar esses índices de contato.

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 (DEGIDI, 2006; KIRMANIDOU, 2016). Porém, está em voga a colocação de implantes com carga imediata, e, em ortopedia, seja muito difícil se evitar a carga, pela impossibilidade de se imobilizar os 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; HASSOUNA, 2022). Com relação à zircônia, Borges e cols. (2020) reportam 0,80 mm de perda óssea marginal após 1 ano de carga mastigatória, sendo as perdas notadas no período cicatricial, havendo uma estabilidade, após os implantes receberem próteses definitivas.

Muitas modificações de superfície em micro e nano-escala foram introduzidas ao longo dos anos, justo para tentar otimizar a ligação do osso ao corpo do implante e da gengiva ao colo dessa raiz artificial, para fazer frente à ação microbiana (CHOPRA, 2024).

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.

Osman e colaboradores (2015), comparando os implantes de titânio com os de zircônia – notar a proximidade dos dois na Tabela Periódica (ver fig. 3) - 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; HASSOUNA, 2022).

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 aqueles 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 de 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).

Em estudos feitos com superfícies tratadas a *laser*, e os resultados mostraram maior molhabilidade nas superfícies tratadas. Autores atribuem melhores resultados devidos à maior energia de superfície conferida pelo tratamento com *laser* e anodização, que tornam a superfície mais hidrofílica, favorecendo a atividade dos osteoblastos (HAO, 2005; GITTENS, 2013; CHOPRA, 2024).

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).

Recentes estudos, utilizando raios laser, anodização eletroquímica em nanoescala, sugerem que as modificações de superfície imitando Espículas, Adagas, Papilas, Espigões e Chamas em nanoescala, podem orientar a disposição dos osteoblastos ao colonizar a superfície dos implantes, e isso teria um efeito favorável na resistência óssea ao redor do implante. Por outro lado, essas mesmas modificações teriam um efeito negativo para a microbiota que tentasse desenvolver um *biofilme* sobre a superfície do implante (CHOPRA, 2024), conforme evidenciado na Figura 1. O processo de anodização consiste em se colocar o implante numa solução eletroquímica, em temperatura ambiente, e aplicar uma corrente elétrica sobre o implante, transformando-o num anodo (+), enquanto uma barra de titânio é o catodo (-). Como a solução é ácida, forma-se uma corrente do negativo para o positivo, fazendo a deposição de uma película. Esse processo permite ótimo controle da superfície pretendida, causando modificações estruturais que variam de 50 a 150 nm. Modificando-se o tempo, a composição dos eletrólitos usados (normalmente, fluoretos/ácido fluorídrico) e variando-se a voltagem e a corrente, podem ser produzidos nanotúbulos, espículas, formações em forma de poços, espadas e chamas. Esse processo simplifica os procedimentos anteriormente usados, que dependiam de alta tecnologia, equipamentos sofisticados e, às vezes, altas temperaturas (GULATI, 2023; CHOPRA, 2024).

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). Já Chopra e colaboradores (2024) demonstrou que a nanotexturização da superfície de implantes de titânio pode levar ao estresse oxidativo de bactérias (como aquele causado por neutrófilos), o que aumentaria o bom prognóstico do implante.

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 (KOHAL, 2004; WELANDER, 2008).

Relatos de casos clínicos demonstram o uso de implantes de zircônia em peça única na substituição de dentes uni e multi-radicularizados 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 edêntulos. 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).

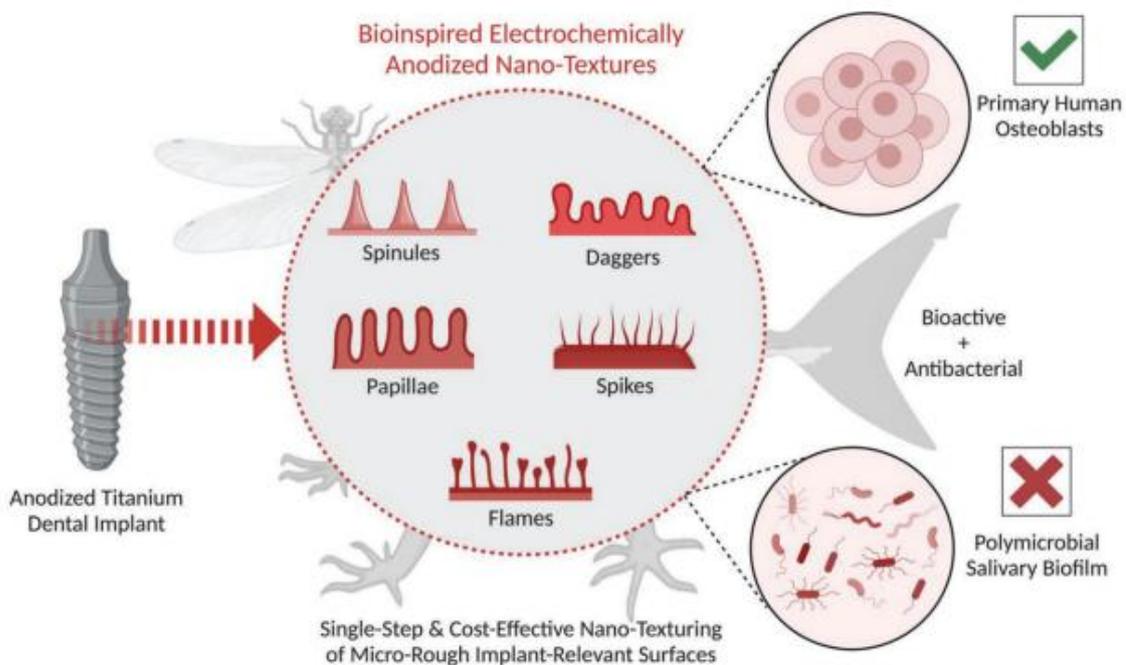


Fig. 1 - A tendência atual para a próxima geração de implantes dentais e ortopédicos de titânio é o tratamento superficial por anodização eletroquímica com “Inspiração Biológica”, mimetizando asas de libélulas, barbatanas de tubarões, folhas de lótus e pele de lagartixa. Além de melhorar a osteointegração e adesão gengival, produz um efeito anti-microbiano. Disponível *online* em: <https://onlinelibrary.wiley.com/cms/asset/ca61f2ca-6f29-4a9e-91c9-4a6254abd736/adfm202314031-fig-0001-m.jpg>

As revisões tentam elucidar se os materiais usados, o desenho exterior, a microestrutura 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. A tendência atual é implantes de titânio em corpo único, com uso de estratégias de nanotexturização por anodização eletroquímica superficial, o que orienta a colonização por osteoblastos e a formação óssea, e dificulta a adesão microbiana (CHOPRA, 2024) (Ver fig. 1).

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 suscetível a defeitos de superfície que podem influenciar negativamente seu comportamento (OSMAN, 2013; ZHANG, 2013; OSMAN, 2014). Dessa forma, um controle de qualidade requintado durante a fabricação deve ser exigido a fim de se assegurar um bom desempenho clínico (OSMAN, 2013; CHOPRA, 2024).

Para minimizar algumas características desfavoráveis da Zircônia, 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 no planejamento da nova geração de implantes, quanto à profundidade ideal das espiras e nanotexturização de superfícies (CHOPRA, 2022) (ver Fig. 2). 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).

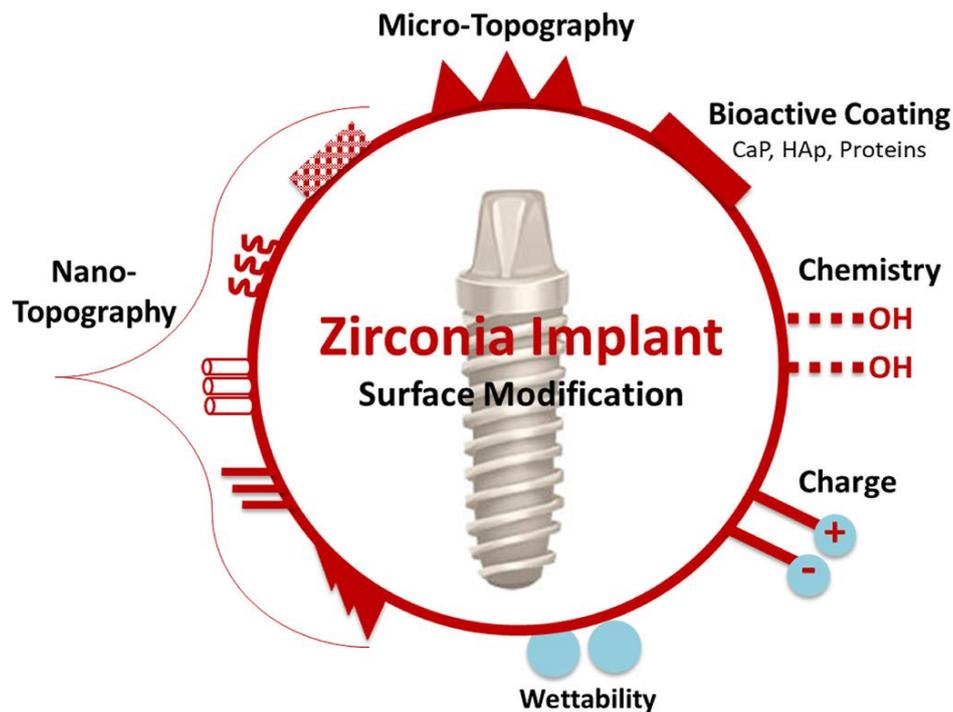


Fig. 2 - Superfícies de implantes modernos de Zircônia recebem os mais variados tratamentos, com estratégias de nanoengenharia para texturização superficial, segundo Chopra (2022). Disponível na Internet em *open access*: https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2452199X21004710-gal_lrg.jpg

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 (OSMAN, 2015; HASSOUNA, 2022). 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 adequado 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.

Porém, com mais recentes tecnologias de tratamento nanosuperficial (CHOPRA, 2024), não só uma impressora 3D será necessária, mas também um aparelho de Anodização, podendo assim os futuros implantes ser produzidos em consultório dentário ou em laboratórios de prótese dental, por um técnico especializado.

1.3 Titânio (TiO₂)

O Titânio (Titanium) é um metal, elemento químico de número atômico 22, tem como símbolo *Ti* e peso atômico de 47,9 . Tem densidade igual a 4,71 e ponto de fusão a 1.670° C e ponto de ebulição a 3.289° C .

Conhecido há mais de 200 anos, teve seu auge após a segunda Grande Guerra, utilizado para a produção de aeronaves. É o nono elemento mais abundante na Terra, e o quarto metal mais abundante, sendo o Brasil um grande produtor. O titânio é facilmente oxidável. Essa superfície de óxido de titânio lhe confere alta resistência à corrosão (RMI, 2000). Essa característica impulsionou sua aplicação na indústria naval, exploração submarina profunda, construção de mísseis, bicicletas, automóveis, indústria química, instrumentos cirúrgicos, implantes dentais e ortopédicos (RMI, 2000). É essa mesma camada de óxido de titânio (TiO₂) que fornece todas as características que propiciam a Osteointegração (ligação desse metal com o osso humano) (RESENDE, 2017). O nome titânio foi dado em homenagem aos Titãs da mitologia, conforme Resende (2017).

A enorme aplicação atual do titânio e suas ligas advém das características únicas de resistência mecânica e à corrosão que apresentam. São também resistentes à fadiga e altas temperaturas, o que as torna ideais para a fabricação de motores e turbinas (RMI, 2000).

As ligas são as de Ti-6AL-4V normal e a de valor intersticial extra baixo (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 comercialmente 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 interface 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 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 fases. 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 $882^\circ C$. A fase α - β pode coexistir, dependendo da faixa de temperatura na adição de alumínio ou vanádio (OSMAN, 2015). Ver Tabela 1, a seguir.

TABELA 1 - Componentes das Ligas de Titânio	
Ligas de Titânio Ti-6Al-4V	
fase α	estrutura metalográfica hexagonal 
fase β	estrutura metalográfica cúbica 
Alumínio	estabiliza a fase α , aumenta resistência \uparrow , diminui densidade \downarrow
Vanádio	estabiliza a fase β

A combinação α - β é a mais utilizada para a fabricação de implantes (OSMAN, 2015). Entretanto, na 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 (TiO_2), biocompatibilidade, estabilidade *in vivo* e excelente osteointegração (SAITO, 2014).

21 44.956 Sc SCANDIUM	22 47.867 Ti TITANIUM	23 50.942 V VANADIUM
40 91.224 Zr	41 92.906	

Fig. 3 - Tabela periódica mostrando a proximidade de Titânio e Zircônia.

1.3.1 Novas ligas de Titânio

São confeccionadas em estrutura porosa. Parece haver indução óssea nos poros da superfície. Podemos ter dois tipos: Macroporos ($>100\mu\text{m}$) e microporos ($\sim 10\mu\text{m}$) (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. Segundo Chopra (2024), a rugosidade da superfície do implante traz desdobramentos com influências biológicas, mecânicas e químicas.

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.

1.4 Zircônia (ZrO₂)

A Zircônia é uma cerâmica resultante da oxidação do elemento químico Zircônio (ou Zirconium). O Zircônio é um metal branco prateado, elemento químico de número atômico 40, tem como símbolo *Zr* ; peso atômico de 91,2 u. e ponto de fusão a 1857° C . É parecido com o titânio e pertence ao mesmo grupo químico (Grupo 4) dos Metais de Transição (ocupando a mesma coluna na Tabela Periódica - fig. 3 e Tabela 2, onde está exatamente abaixo do Titânio. Este no quarto período, e o Zircônio no quinto período).

TABELA 2 – Titânio e Zircônio na Tabela Periódica									
Elemento	símbolo	grupo	período	óxido	n°. atôm.	peso atôm.	fusão ° C	Ebulição ° C	cor
Titânio	Ti	IV	4°	TiO ₂	22	47,9	1670	3289	Cinza escuro
Zircônio	Zr	IV	5°	ZrO ₂ Zircônia	40	91,2	1857	4409	Cinza claro

O nome Zircônio vem de Zircão, e do persa “zargun” significando cor dourada. Foi descoberto em forma impura em 1789, por Martin Klaproth (o mesmo que deu nome ao Titânio), e só em 1914 foi tratado como metal puro. Porém, o “zircão” já era citado em textos bíblicos (EMSLEY, J. , 2003):

“Êxodo 28:15-21, zircão, listado como “jacinto” é a primeira pedra preciosa na terceira fileira do peitoral de Aarão. Este objeto sagrado apresenta 12 pedras preciosas para representar as 12 tribos de Israel.”

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). Outras vantagens são 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, 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 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 monoclínica 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. 4). 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 ideia 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. 4 - 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) Zircônia Policristalina Tetragonal Estabilizada com Ítrio (3Y-TZP)

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 ítrio (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 fase 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).

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 Monoclinica.
- ❖ 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).

TABELA 3		Óxido de Zircônio
temperatura	Cristalografia da Zircônia	ZrO ₂
até 1170 °C	forma cristalográfica monoclinica	
1170 °C - 2370 °C	forma cristalográfica tetragonal	
acima 2370 °C	forma cristalográfica cúbica	

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. 3), 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 3).

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 coorte (*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). E, pesquisas prospectivas posteriores 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).

1.4.1 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 (OZKURT, 2011; SAITO, 2014; ELIAS, 2015-1), 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 (HClO_3) 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; BORGES, 2020; GULATI, 2023), 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 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. 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 de diâmetro mais estreitos de Ti-Zr mostraram o mesmo sucesso (> 95%) que os implantes de titânio de diâmetro normal (ALTUNA, 2016). Se esses resultados forem reprodutíveis, implantes de diâmetros estreitos de Ti-Zr podem substituir até molares unitários, sem necessidade de enxerto, o que simplifica e torna o tratamento muito mais acessível (BADRAN, 2017).

O uso de implantes de titânio tem alto nível de sucesso e está muito bem documentado (ALTUNA, 2016; OSMAN, 2015; BORGES, 2020; GULATI, 2023).

1.5 Neutr3filos sobre Implantes

Neutr3filos s3o as primeiras c3lulas a interagirem com a superf3cies dos implantes, j3 no momento da inser3o cir3rgica (RESENDE, 2017).

J3 3 conhecido o poder transcricional do neutr3filo e sua libera3o de IL-8 (interleucina), produ3o de citocinas e quimiocinas (NAUSEEF, 2016). Existem neutr3filos associados a tumores (NATs) e subpopula3es, ou polariza3o, de neutr3filos:

N1 = anti-tumorg3nicos, pro-inflamat3rios e

N2 = pro-tumorg3nicos, imunossupressivos, anti-inflamat3rios (Oliveira, 2016; NAWAS, 2017). Tamb3m chamados fen3tipos N1 e N2 (NAWAS, 2017). Essa polariza3o j3 havia sido descrita por Fridlender, Z.G. e colaboradores, em 2009.

As caracter3sticas encontram-se resumidas na Tabela 4:

TABELA 4 - Subpopula3es de Neutr3filos	
N 1	N 2
pro-inflamat3rios	anti-inflamat3rios
anti-tumorais	pro-tumorais
n3o imunossupressivos	imunossupressivos
baixos n3veis de TGF β ↓	altos n3veis de TGF β ↑
CXCR4 ↓	CXCR4 ↑

Neutr3filos associados a tumores (N2) sofrem indu3o por altos n3veis de TGF β (*transforming growth factor- β* = Fator β de crescimento e transforma3o), s3o caracterizados por alta express3o de Receptor 4 de Quimiocina CXC (CXCR4), fator de crescimento vascular endotelial – o que favorece o crescimento tumoral – e matriz metaloproteinase. J3 os neutr3filos n3o associados a tumores (N1) s3o induzidos pela inibi3o da sinaliza3o do TGF β , expressam citocinas e quimiocinas pr3-inflamat3rias, e podem matar c3lulas cancerosas.

Os neutr3filos podem se diferenciar em c3lulas dendr3ticas, e tudo indica que o micro ambiente possa tanto influenciar a diferencia3o como controlar a especializa3o dos neutr3filos (OLIVEIRA, 2016; TREFFERS, 2016; SINGEL, 2016).

Os neutr3filos t3m um papel muito maior do que o imaginado, e interagem com outras c3lulas do sistema imunol3gico (SCAPINI, 2014; NAUSEEF, 2014). Esses fag3citos

amebiformes estão sempre vasculhando o ambiente à procura de pistas de invasores, e respondem rapidamente por ingestão, morte ou degradação de potenciais patógenos (VIRELLA, 2007; SCAPINI, 2014).

Os neutrófilos derivam-se de células tronco hematopoiéticas (CAWLAND, 2016), têm memória (como outras células imunológicas) (NAUSEEF, 2016), são dinâmicos e móveis, representando a primeira linha de defesa contra organismos infectantes (ENGLISH, D., 2005; NAUSEEF, 2016), sendo considerados por Gabrilovich (2005) como um modelo único para o estudo de questões fundamentais da biologia molecular. 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 (GABRILOVICH, 2005), devido à série de sinalização que desencadeiam e aos problemas que causam por, estando ativados, permanecer nos tecidos ou retornar aos vasos sanguíneos capilares (BOSSOM, 2013).

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.

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). Uma vez ativados, liberam estruturas em redes formadas por ácidos nucleicos bem como por cromatina modificada (já que não utilizam o ADN para replicação, por ser uma célula madura e terminal) (ENGLISH, 2005). NETose constitui importante estratégia da imunidade inata para matar patógenos extracelulares. As fitas de cromatina pegajosa imobilizam os microorganismos, impedindo sua disseminação pelo organismo e na circulação sanguínea. A formação de NETs na circulação periférica pode causar microtrombose e romper a barreira hemato-encefálica (BOELTZ, 2017; GUIMARÃES-COSTA, 2017).

Neutrófilos trocam informações 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 (NAWAS, 2017). - Ver figura 5 -

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, precisa ser removido sem causar respostas imunológicas, o que é feito pelo processo chamado de eferocitose (deCATHELINEU, 2003; GARDAI, 2005).

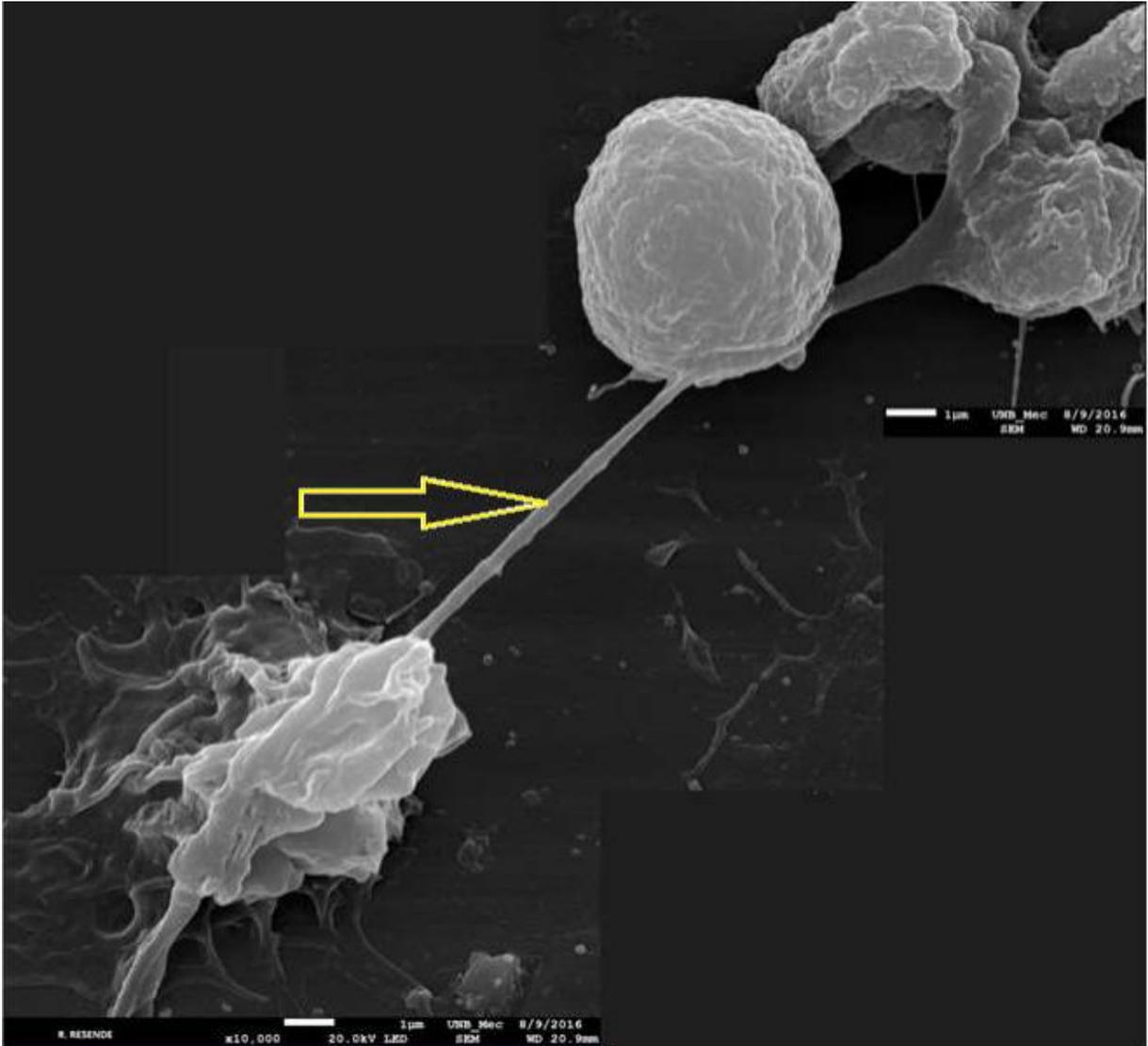


Fig. 5 - Prancha com três microfotografias de neutrófilos ativados sobre superfície de titânio. A seta mostra um TNT (túnel de nano-túbulo = extensão túbulo-vesicular) permitindo comunicação entre as células (RESENDE, 2017).

1.6 Células Pluripotentes

Células pluripotentes ou totipotentes são células embrionárias, que podem se diferenciar em qualquer tipo de tecido embrionário ou adulto (TABANSKY, 2016).

1.6.1 Células Multipotentes são células que podem dar origem a múltiplas células dentro de uma linhagem (TABANSKY, 2016).

1. 6. 1.1 Células Mesenquimais

Dentre as Células Multipotentes, temos as Células Mesenquimais Indiferenciadas.

A maioria de coleta de células-tronco mesenquimais é feita na medula óssea, a despeito da baixa quantidade dessas células presentes nela, como sugere Pratheesh (2012). Outras fontes doadoras também são: cérebro, tecido adiposo, cordão umbilical, bem como sangue, fígado, e rim de tecidos fetais, e, ainda, no tecido amniótico, segundo Pratheesh (2012). Sendo o líquido amniótico uma possível fonte doadora de células mesenquimais, podendo estas se diferenciar em diversos tipos, incluindo tecido cardíaco, células neurônio-símile (células análogas a neurônios), nos relata Pratheesh (2012).

Como a coleta desse líquido é relativamente fácil, o líquido amniótico deve ser considerado como fonte doadora alternativa de células tronco fetais (PRATHEESH, 2012), assim como o cordão umbilical de recém-nascidos (LEYENDECKER, 2018).

As células mesenquimais indiferenciadas de líquido amniótico de caprinos expressa marcadores típicos como CD-29, CD-90, CD-166, CD-73, CD-105, CD-49 e CD-117 , com marcação negativa para marcadores de superfície hemopoiéticos CD-45, CD-34 e CD-14 , conforme Pratheesh (2012).

Sendo que, em humanos, foram observados os marcadores de superfície Oct-4, Nanog, Sox-2, SSEA-1 e SSEA-4 específicos de células pluripotentes (PRATHEESH, 2012).

A engenharia de tecidos é um campo que está se desenvolvendo muito ultimamente. É muito importante a escolha correta da fonte de células embrionárias. As fontes doadoras podem ser a medula óssea, cordão umbilical, músculos, gordura e a polpa dental. As células-tronco da polpa dental só foram isoladas a partir do ano 2000. Porém, hoje, na engenharia de tecidos, o emprego da polpa dental para extração de células-tronco tem se mostrado como um campo dos mais promissores (LEYENDECKER, 2018). Além disso, as células-tronco de polpa dental servem para se estudar a carga genética do paciente (BUENO, 2020).

1. 6. 1.2 Células de Polpa Dental

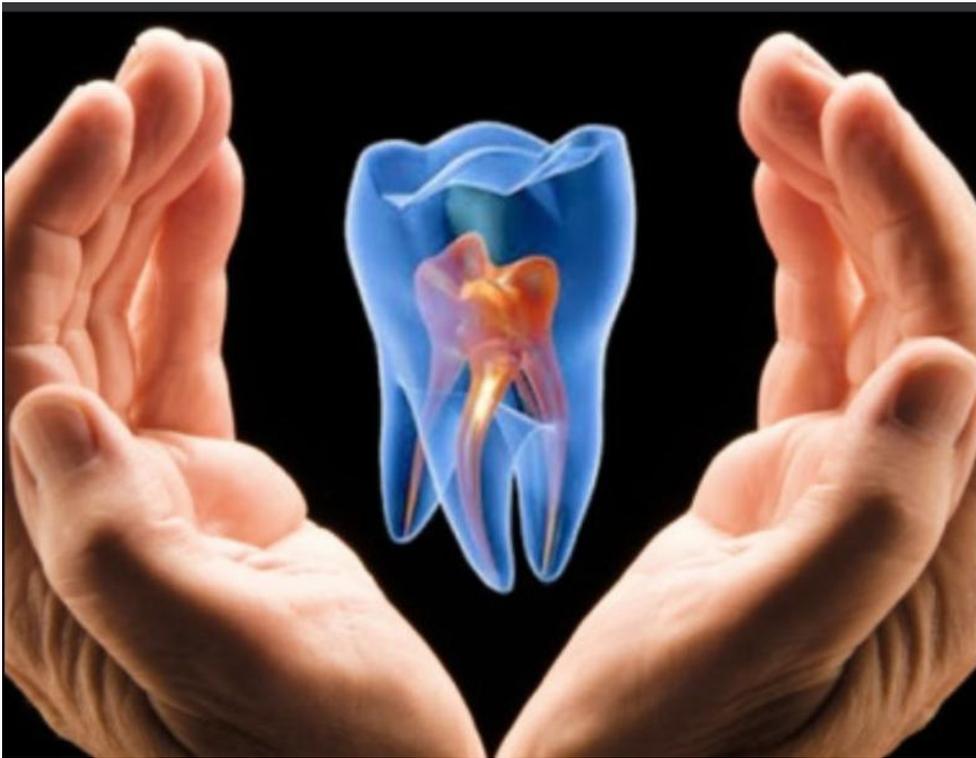


Fig. 6 - Desenho esquemático mostrando a polpa dental já formada de um dente molar. Atualmente a polpa dental de dentes decíduos e de dentes permanentes em formação são consideradas excelentes fontes de células-tronco embrionárias.

O grande sucesso das células da polpa dental deve-se principalmente à facilidade de coleta (LEYENDECKER, 2018) – uma vez que os dentes de leite esfoliam em idades pré-determinadas e os 3^{os} molares são removidos entre os 13 e 18 anos de idade (principalmente por motivos ortodônticos). Ainda, essas células têm grande potencial proliferativo e de diferenciação em múltiplas linhagens, podendo fazer osteogênese, dentinogênese, adipogênese, condrogênese e até neurogênese (LEYENDECKER, 2018).

Ainda de acordo com Leyendecker e colaboradores (2018), a polpa dental proporciona dois tipos de subpopulações: aquelas de dentes decíduos e aquelas de dentes permanentes. Como era de se esperar, as células-tronco de dentes decíduos são menos embriologicamente diferenciadas que as de dentes permanentes, e, por isso, têm maior poder proliferativo.

Em todo esse contexto, há de se ponderar que a idade dos dentes varia muito. Explicando melhor: O desenvolvimento do dente está ligado a sua erupção. É a formação e crescimento da raiz que fazem com que o dente rompa a estrutura óssea e a gengiva que o separam da cavidade oral. Um primeiro molar permanente faz sua erupção por volta dos 5-6 anos de idade. Já os segundos molares, só erupcionam aos 12 anos. Nessa idade, os 3^{os}

molares só têm a coroa formada, sendo a polpa enorme e de fácil acesso. Como, em casos de falta de espaço para o alinhamento de outros dentes, muitos ortodontistas solicitam sua remoção nessa idade, isso torna fácil a coleta e armazenamento das células-tronco dos 3^{os} molares permanentes.



Fig. 7 - Dentes decíduos (de leite) extraídos ou dentes ciso (3^{os} molares) [acima] têm no seu interior uma polpa dental ainda em formação e rica em células multipotentes (seta). [Foto do autor]

A utilização pode ser a mais variada possível, indo desde o reparo de defeitos ósseos causados por doença gengival até a reconstrução da calota craniana ou administração endovenosa, para tratar osteoporose (LEYENDECKER, 2018). Por exemplo, o paciente pode sofrer um acidente e ter perda de parte da calota craniana. Com células-tronco da polpa dental, pode ser induzida a regeneração óssea do defeito (LEYENDECKER, 2018), o que, até há pouco tempo, só era resolvido com uma prótese (calota artificial) de acrílico para substituir o osso.

Uma das razões dessas células darem tão bons resultados, reside no fato de as células-tronco mesenquimais da polpa reterem células embrionárias da crista neural (BUENO, 2020), serem facilmente obtidas e expandidas, podendo ser usadas com ou sem um arcabouço, sem a necessidade de uma área doadora cruenta (LEYENDECKER, 2018).

1.7 Osso

O osso é uma matriz orgânica com estrutura mineralizada secretada por osteoblastos (HALL, 2017), constituído de Matriz óssea e Células (MATSUDA, 2010).

A **Matriz óssea** é formada de Colágeno tipo I e Proteínas não colágenas, tais como: Osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas e osteoglicanas (MATSUDA, 2010). O osso compacto tem cerca de 30% de matriz e 70% de sais minerais (HALL, 2017). A matriz orgânica óssea tem aproximadamente 92% de fibras colágenas, sendo o restante um meio gelatinoso homogêneo, chamado *substância fundamental* que é constituída por líquido extracelular e proteoglicanos (sulfato de condroitina e ácido hialurônico)(HALL, 2017). O sal cristalino, principalmente composto por cálcio e fosfato, é conhecido como hidroxiapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que é a mesma substância que compõe os dentes (HALL, 2017). As fibras colágenas são dispostas ao longo das forças de tensão, o que confere grande resistência aos ossos (HALL, 2017).

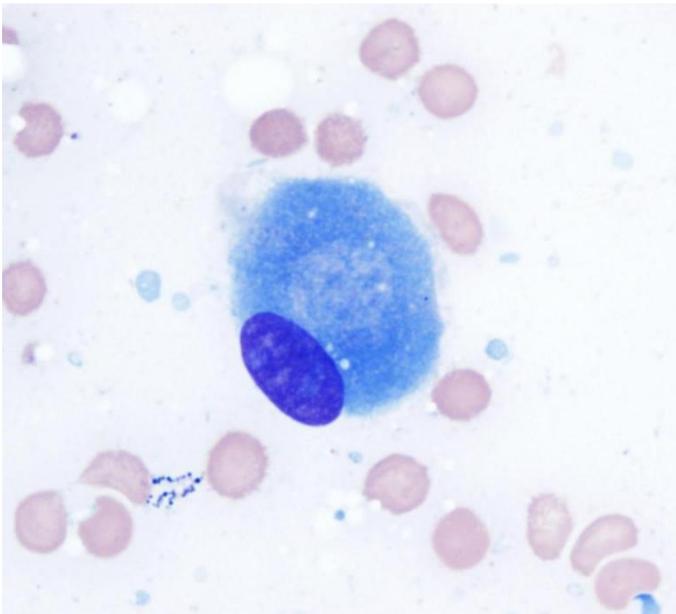


Fig. 8 - Osteoblasto e núcleo azuis.

As **Células ósseas** são: Osteoblastos, osteócitos, células de revestimento e osteoclastos. Os osteoblastos são responsáveis pela deposição de substância mineral (MATSUDA, 2010; HALL, 2017). Essas células especializadas advêm de células mesenquimais indiferenciadas presentes na medula óssea (também chamadas células-tronco mesenquimais, células-tronco esqueléticas ou células do estroma da medula) (MATSUDA, 2010).

Os osteoblastos caracterizam-se por ter uma ou mais camadas de pré-osteoblastos adjacentes à camada única de osteoblastos com células cuboides características, basófilas, polarizadas, com abundante retículo endoplasmático (MATSUDA, 2010) (por sua função secretória e

deposição óssea). São encontrados no periósteo e endósteo (MATSUDA, 2010) e no ligamento periodontal (a estrutura que envolve as raízes dentárias). São responsáveis pela síntese de colágeno tipo I e demais proteínas da matriz óssea, tendo alta atividade de fosfatase alcalina (MATSUDA, 2010)

Os osteócitos estão dentro da matriz mineralizadas e mantêm comunicação por seus prolongamentos citoplasmáticos nas lacunas/canais ósseos (MATSUDA, 2010). São células estreladas responsáveis pela manutenção da massa óssea, controlando a atividade dos osteoclastos e respondendo a estímulos mecânicos externos (como pressão e tração) (MATSUDA, 2010). O estudo dos osteoblastos mudou muito nas últimas décadas, pela identificação e caracterização das proteínas secretadas por essa célula, e pela função e transcritos do ARN mensageiro (ARNm), bem como por experimentos de proliferação e diferenciação vistos por parâmetros morfológicos, bioquímicos e moleculares (STEIN, 1993).

As células de revestimento são células achatadas presentes na superfície óssea. Na verdade, são osteoblastos inativos, que podem entrar em atividade e iniciar deposição óssea (MATSUDA, 2010).

As proteínas não colágenas fazem a regulação das atividades das células ósseas e participam da maturação da matriz. Já as células ósseas, por sua vez, produzem colágeno tipo I, proteínas da matriz óssea, e são responsáveis pela mineralização e função ósseas. (MATSUDA, 2010) Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção matriz mineral óssea, sendo células derivadas de células-tronco hematopoiéticas (MATSUDA, 2010) Assim, são mais parentes das células sanguíneas que das células ósseas propriamente ditas .

Os osteoblastos secretam proteínas (MATSUDA, 2010). No final da proliferação celular, há um aumento de Fosfatase Alcalina suficiente para ser detetado por métodos histoquímicos (STEIN, 1993). É por meio dessas proteínas secretadas que caracterizamos a diferenciação dos osteoblastos (MATSUDA, 2010). E é por esse motivo que nosso desenho experimental incluiu, nas trocas de meio de cultivo, a coleta de sobrenadante – com o secretoma , para que possa ser submetido a estudo de proteômica, no futuro.

In vitro, os osteoblastos secretam primeiramente uma matriz colágena não mineralizada. Quando os osteoblastos sofrem maturação, essa matriz é remodelada, e começa haver deposição ordenada de hidroxiapatita (STEIN, 1993; MATSUDA, 2010), e a diferenciação em osteócitos (MATSUDA, 2010). Durante a diferenciação progressiva do fenótipo ósseo, a expressão sequencial já foi mapeada por análise *Northern blot* (STEIN, 1993).

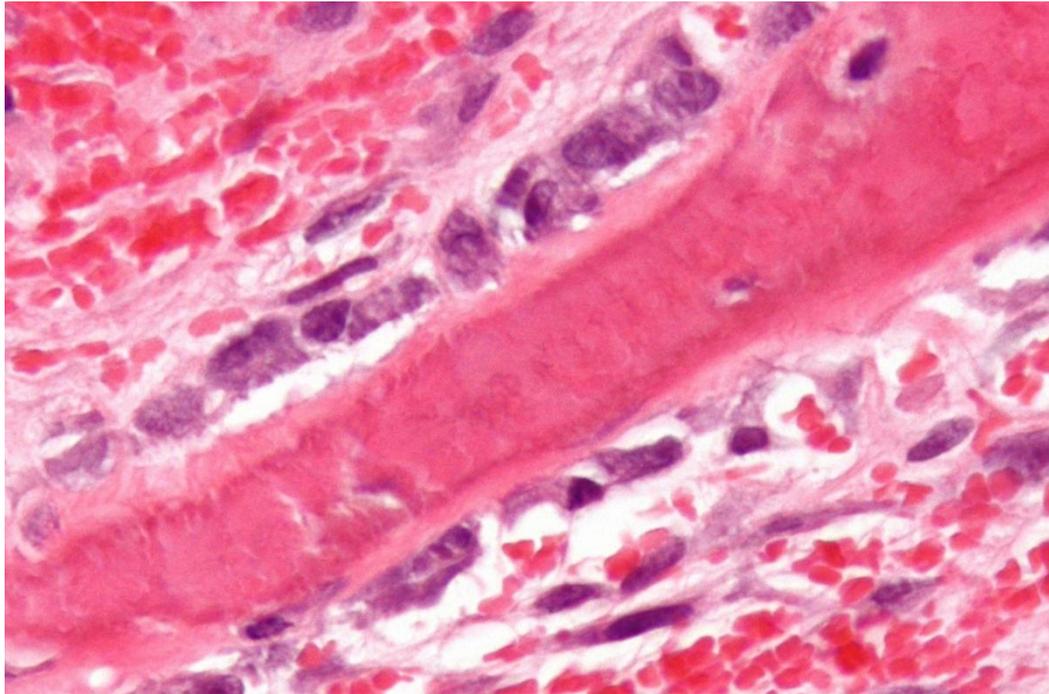


Fig. 9 - Osteoblastos (em azul) ao redor de uma espícula óssea, num caso de hipercalcemia. Fonte: Em CC no endereço https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3e/Bone_hypercalcemia_-_cropped_-_very_high_mag.jpg

Assim que colocados em Meio de Cultivo, os osteoblastos começam a produzir Fosfatase Alcalina (FAL), osteocalcina e osteopontina que são expressadas com a ativação de genes da proliferação (MATSUDA, 2010). Entre os dias 1 a 12 do cultivo, há proliferação celular intensa, e expressão de genes reguladores do crescimento celular. Depois de atingido esse patamar, a proliferação celular diminui e a taxa de Fosfatase alcalina aumenta, marcando o início da deposição ordenada de matriz extracelular, que culmina com a formação de camadas transversais de colágeno e há mineralização da matriz extra celular (STEIN, 1993; MATSUDA, 2010). A expressão de ARNm mensageiro e a atividade enzimática de Fosfatase Alcalina aumentam mais de 10 vezes. Há, neste período, a expressão de outros genes como do colágeno tipo I, fibronectina e Fator Transformador de Crescimento- β (TGF- β) (STEIN, 1993; MATSUDA, 2010). Quanto mais perto do início da mineralização, mais aumenta a expressão do gene da colagenase. Quando se inicia a mineralização, há expressão de proteínas como osteocalcina (proteína Gla óssea), osteopontina e sialoproteína óssea (STEIN, 1993; MATSUDA, 2010), e as células se tornam fosfatase alcalina positivas em histoquímica (STEIN, 1993).

Marcadores do fenótipo osteoblasto são as proteínas osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea, uma vez que são muito expressadas durante a fase de calcificação da matriz extracelular (STEIN, 1993; MATSUDA, 2010) Os osteoblastos também expressam

outras proteínas com as ligadas à adesão celular (a proteína fibrosa fibronectina, as glicoproteínas trombospondina e tenascina) e proteoglicanos (proteínas fortemente glicosiladas: biglicana e decorina). Contudo, essas são fracas marcadores para osteócitos (MATSUDA, 2010). Em culturas com muita ossificação, o nível celular do ARNm da fosfatase alcalina mostra-se diminuído (STEIN, 1993).

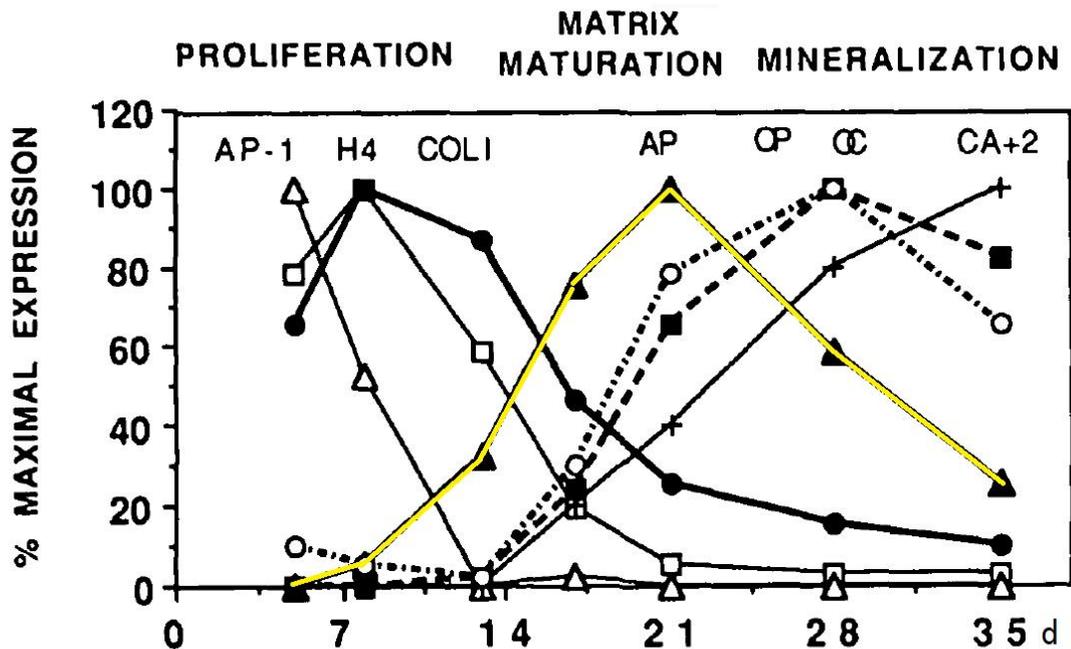


Fig. 10 - Gráfico de Tempo de Cultivo *versus* % de Expressão de Enzimas e Proteínas nos períodos de Proliferação, Maturação e Calcificação da Matriz Óssea. Em amarelo, a expressão de Fosfatase Alcalina. Modificado de Stein et al. (1993) em Open Access em: <https://doi.org/10.1210/edrv-14-4-424>

Osteocalcina é a proteína não colágena mais característica dos osteoblastos. Secretada inicialmente como um precursor de 10 kDa, ela é também encontrada em osteoblastos, cementoblastos (no ligamento periodontal), e condrócitos hipertróficos (MATSUDA, 2010). A osteocalcina é dependente da vitamina K, também conhecida como a proteína óssea que contém ácido gamma-carboxiglutâmico (BGLAP), é uma proteína não colágena de 49 aminoácidos tendo função hormonal e pesa 5,7 kDa (STEIN, 1993). Expressa somente após a fase proliferativa, ela pode ser localizada no osso e na dentina, uma vez que é produzida por osteoblastos e odontoblastos (na polpa dental). A vida média dessa proteína é muito curta, sendo metabolizada pelo fígado e excretada pelos rins (STEIN, 1993). (Ver fig. 11)

➤ A Osteocalcina pode se ligar à hidroxiapatita e, assim, passar a fazer parte da matriz óssea (STEIN, 1993). De toda osteocalcina sintetizada, cerca de 20% não é incorporada ao

osso, passando à circulação sanguínea. Comparando mulheres saudáveis e mulheres com osteoporose, encontra-se correlação significativa dos níveis de osteocalcina medidos por histomorfometria (HALL, 2017).

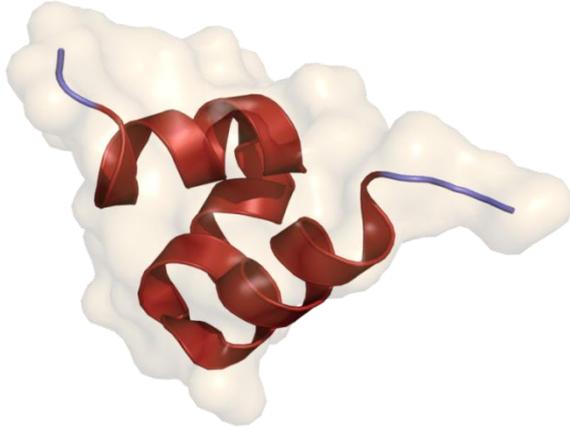


Fig. 11 - Proteína óssea Osteocalcina Disponível online em CC em: https://gl.wikipedia.org/wiki/Osteocalcina#/media/Ficheiro:Osteocalcin_1Q8H.png

Também nas patologias em que há crescimento ósseo, ou aumento da atividade osteoblástica, os níveis de osteocalcina estão aumentados, assim como de outros marcadores como fosfatase alcalina e histomorfometria óssea. Devido ao seu metabolismo renal, também está aumentada na insuficiência renal aguda (HALL, 2017)

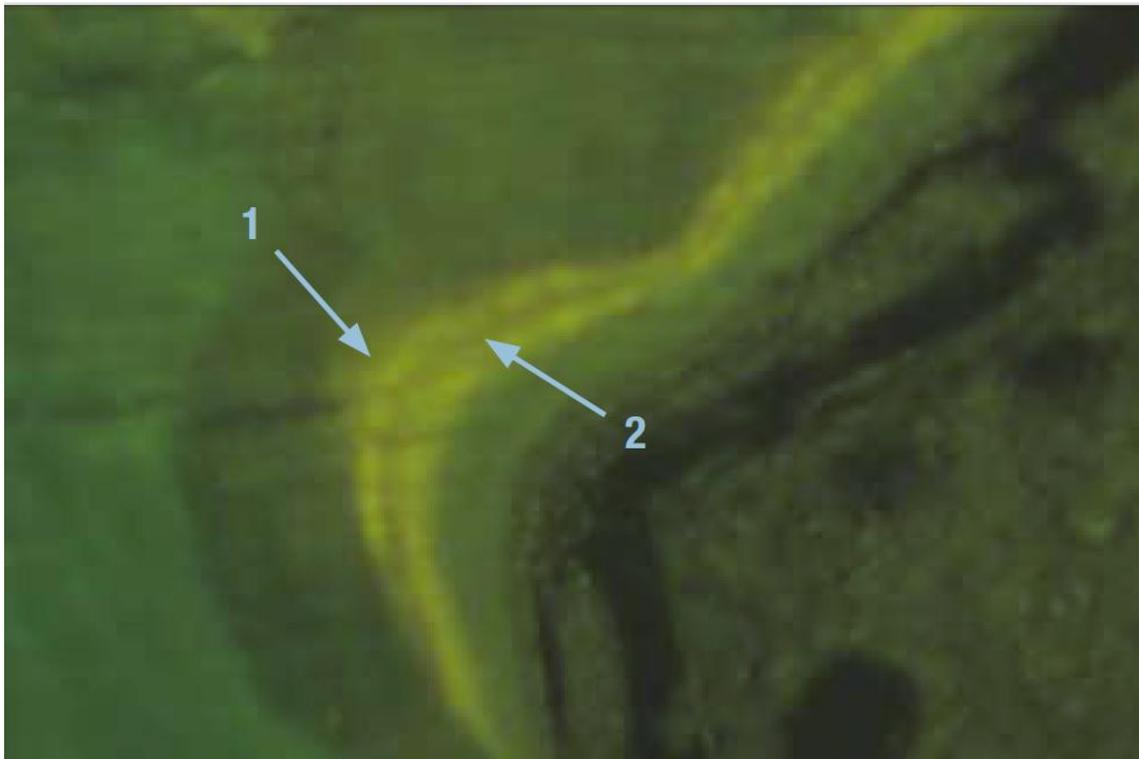


Fig. 12 - Histomorfometria óssea mostrando área de neoformação óssea (em vermelho), com

camada de osteoblastos (com suas células cuboides típicas) logo abaixo. Linhas amarelas dos marcadores de tetraciclina nos crescimentos ósseos. As medidas são comprimento, largura, altura e densidade (KULAK, 2010)

A histomorfometria óssea consiste no exame microscópico feito numa pequena amostra de osso não descalcificado, para estudar quantitativamente a estrutura óssea e o processo de remodelação pelo qual o osso está passando. É um método diagnóstico de alta precisão (KULAK, 2010).

Sendo produzida por osteoblastos, a osteocalcina é muito utilizada como marcador para processos que levam a aumento ósseo. Em terapias com fármacos anabolizantes para a formação óssea e na osteoporose, níveis sanguíneos altos de osteocalcina foram significativamente correlacionados com o aumento de densidade mineral dos ossos. Ela pode também ser usada como biomarcador para efetividade de um fármaco que induza formação óssea (HALL, 2017).

Em Patologia clínica, a taxa de Osteocalcina está elevada em casos de:

- doença de Paget (osteíte deformante),
- hipertireoidismo,
- hiperparatireoidismo,
- osteomalácia,
- acromegalia e osteodistrofia renal,
- recuperação de fraturas,
- osteoporose,
- insuficiência renal crônica,
- metástases ósseas (raramente).

E a taxa de Osteocalcina se encontra baixa em casos de:

- hipotireoidismo,
- hipoparatiroidismo,
- deficiência de hormônio do crescimento,
- cirrose biliar. (HALL, 2017)

➤ Osteonectina é uma proteína de 32 kDa isolada em células óssea, tecidos embrionários, fibroblastos, células endoteliais de ovário e pulmão (Matsuda, 2010).

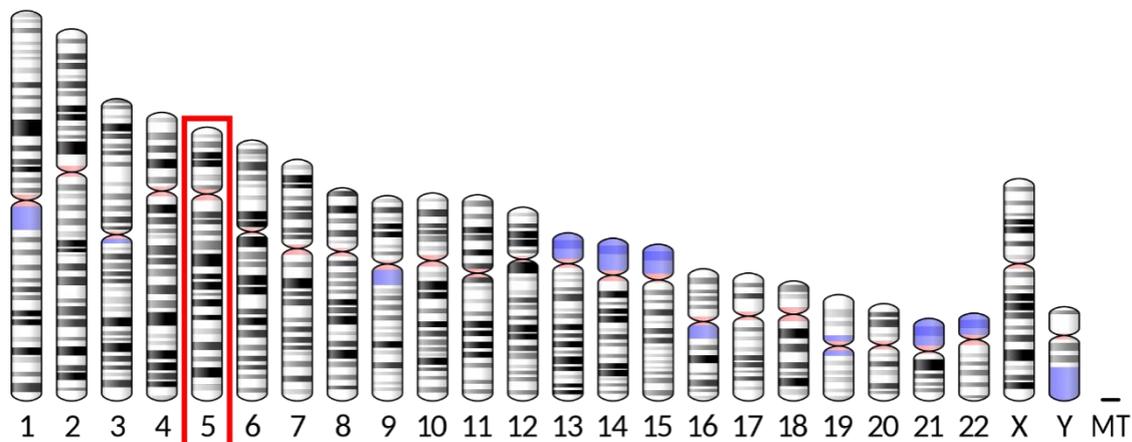
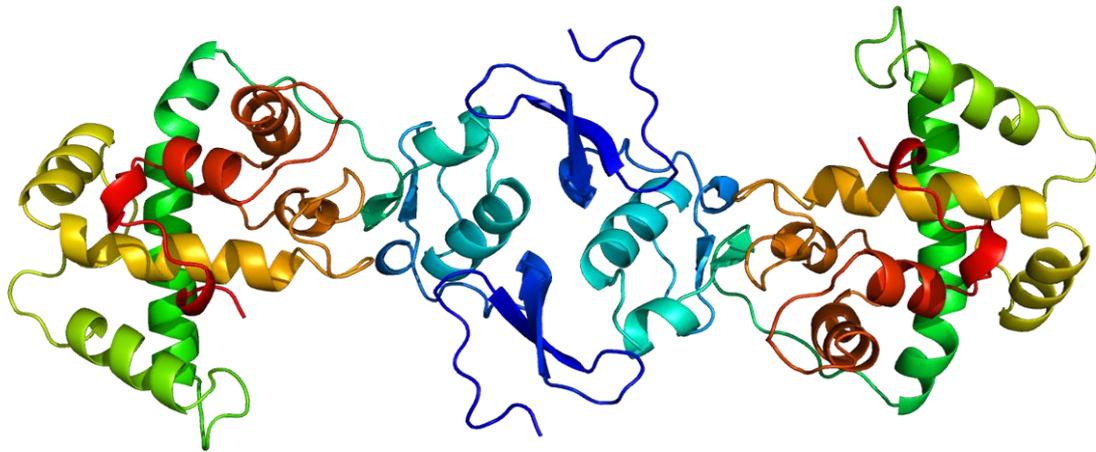


Fig. 13 - Osteonectina - O gene humano SPARC tem comprimento de 26,5 kb, contendo 10 exons e 9 introns e está localizado no cromossoma 5q31-q33. EM azul temos ..., e em vermelho ... (Wiki) Disponível em https://en.wikipedia.org/wiki/Osteonectin#/media/File:Protein_SPARC_PDB_1bmo.png e National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine

➤ Osteopontina (OPN) é uma fosfoproteína (também chamada SPP I) de aproximadamente 34 kDa, mas que, após as reações pós-traducionais, dependendo se pouco ou muito fosforilada, passa a pesar de 44 kDa a 75 kDa, respectivamente. Seu papel na mineralização está relacionado à migração de células, e sinalização que influencia proliferação celular, organização do citoesqueleto, motilidade, fagocitose e apoptose, (Matsuda, 2010)

Osteopontina tem a função biológica de regulação de Neutrófilos (quanto à migração); Macrófagos (quanto à ativação celular e inibição da apoptose); Linfócitos (quanto à ativação, diferenciação e inibição da apoptose); Mastócitos (quanto à migração e degranulação); Osteoclastos (quanto à ancoragem da célula à matriz mineral do osso e indução do remodelamento ósseo).

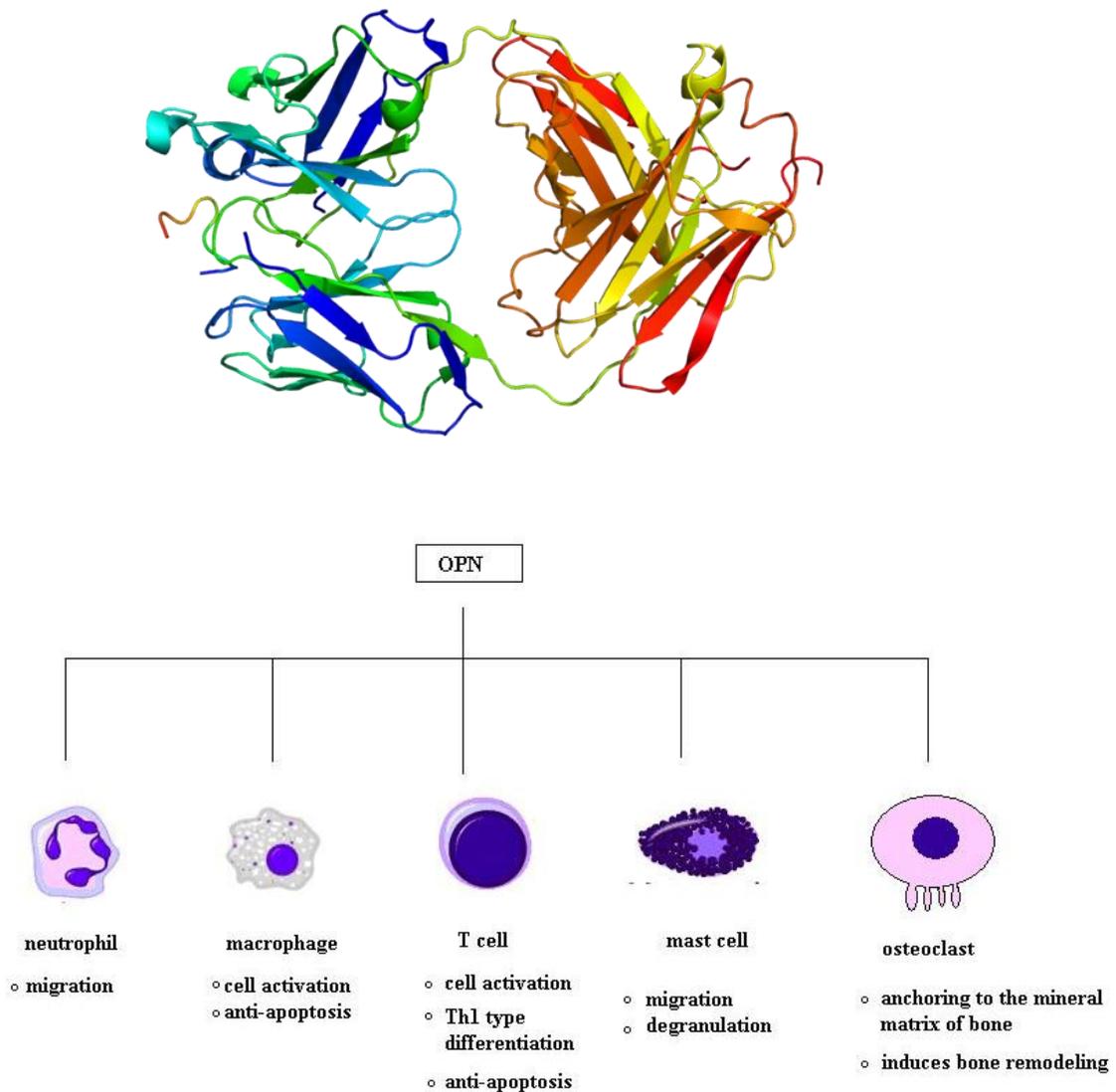


Fig. 14 - A Osteopontina regula os neutrófilos e osteoclastos. Disponível online em CC em: https://en.wikipedia.org/wiki/Osteopontin#/media/File:Biological_functions_of_OPN.jpg

➤ A Fosfatase Alcalina é largamente utilizada como marcador de osteoblastos. Pode ser encontrada em vários organismos desde bactérias até humanos (HALL, 2017).

➤ As *Unidades Ósseas Multicelulares* são unidades especializadas constituídas de osteoclastos, osteoblastos suas respectivas células precursoras e associadas sendo esse conjunto responsável pela remodelação óssea e manutenção do esqueleto humano (MATSUDA, 2010). (Fig. 15)

➤ Já o *osteon* é uma unidade circular com um canal principal contendo um osteócito. Nessa unidade se desencadeiam várias reações bioquímicas (Fig. 16)

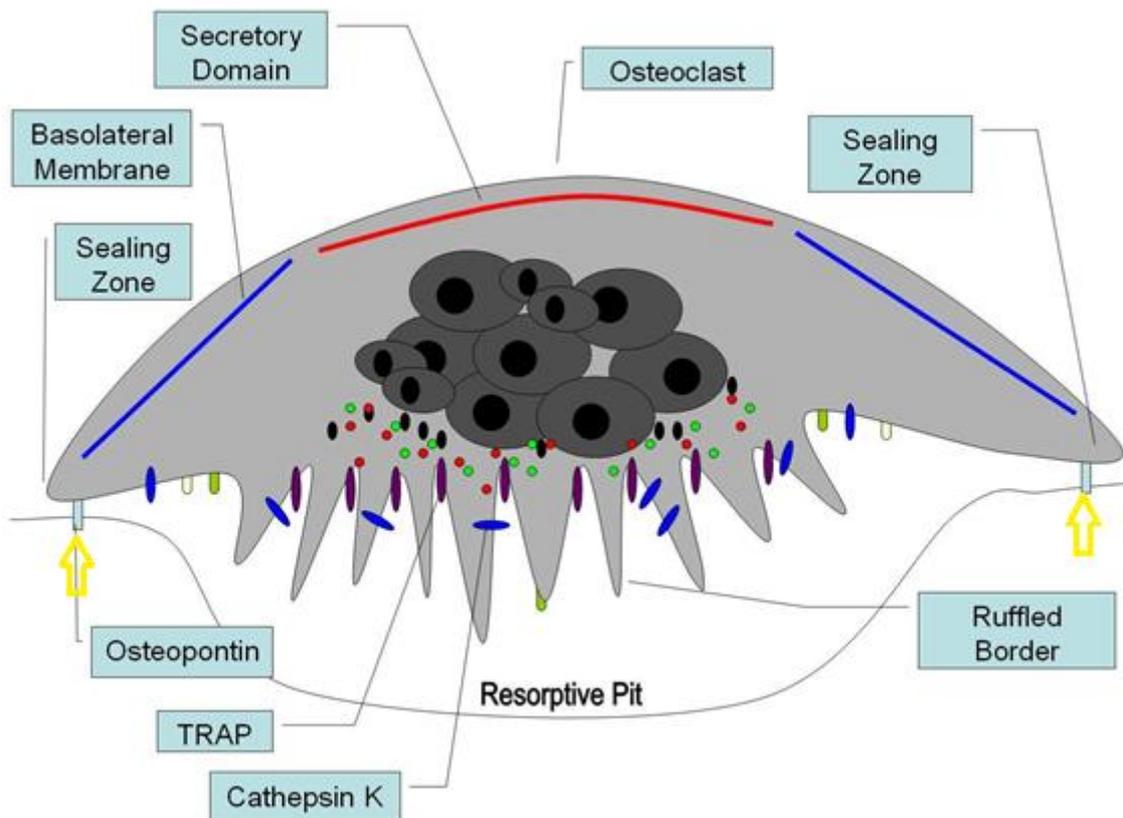


Fig. 15 - Osteoclasto, em ação numa lacuna de reabsorção, circundado por Osteopontinas (em azul claro, na zona de selamento - setas) fazendo a ancoragem da célula à matriz mineral da estrutura óssea. Em: <https://en.wikipedia.org/wiki/Osteopontin#/media/File:Osteoclast1.jpg>

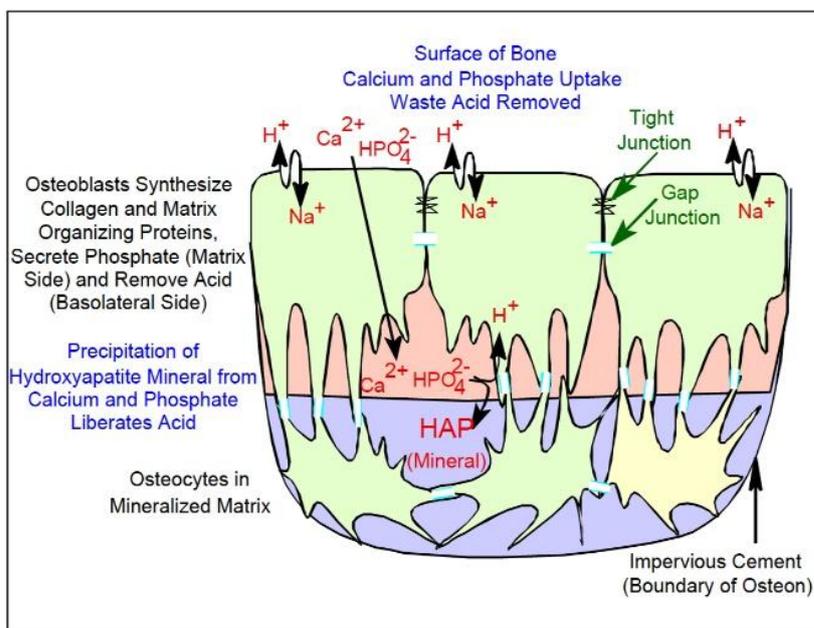


Fig. 16 - Osteon . Complexo de formação óssea, composto por Osteoblastos e Osteócitos.

O osso é composto, em sua matriz, de colágeno tipo I. E é também constituído por células. Além da matriz tem proteínas como osteocalcina, osteonectina, sialo-proteína óssea e várias proteoglicanas que controlam as funções das células do osso e da maturação da matriz óssea (MATSUDA, 2010). O colágeno tipo II é uma proteína que está mais relacionada à cartilagem e tecidos elásticos.

Dentre as células da medula óssea, temos as Células Mesenquimais Indiferenciadas. Para que haja osteointegração, as células mesenquimais devem colonizar a superfície do implante, e se diferenciar em osteoblastos. Essa diferenciação ocorre espontaneamente (sem necessidade de interferência externa) em humanos, mas o mecanismo é desconhecido (OLIVARES-NAVARRETE, 2010) . Por isso, quanto mais estudos científicos forem feitos para elucidar esse mecanismo de transformação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, e destes em osteócitos, tanto melhor poderá ser modulada e reconstituição do aparelho estomato-gnático por meio de implantes osteointegráveis.

2. JUSTIFICATIVA

Para que ocorra a osteointegração, é necessário que ocorra um bom contato entre células osteoprogenitoras e a superfície do biomaterial. A célula deve se aderir, proliferar, diferenciar e produzir matriz mineralizada extracelular (STIEHLER, 2008).

A relevância biológica da cultura de osteoblastos reside no fato de ser um modelo de diferenciação de células ósseas suportado por expressões gênicas (STEIN, 1993).

Para se avaliar superfícies de implantes, a proliferação de osteoblastos representa a chave para a osteointegração, refletindo a boa relação tecido-implante (CHOPRA, 2024). E Olivares-Navarrete (2010) demonstrou que células indiferenciadas humanas sofrem influência de diferenciação por substratos de superfícies de implantes, e não por contato direto.

Se a Bioengenharia de Tecidos surgiu modestamente em 2001, hoje representa um campo inovador, de vanguarda e excitante, sendo um assunto de ponta do conhecimento científico. Nesse contexto, as células mesenquimais, como material de enxerto, representam o padrão ouro na ortopedia, com células de dentes decíduos e de tecido adiposo (BUENO, 2020).

As células mesenquimais indiferenciadas têm efeito até sobre macrófagos (FERNANDES, 2020), quanto mais estudadas, mais vão sendo entendidas suas interações.

Como já está bem demonstrada a interação dos neutrófilos tanto com superfícies de titânio, como com as de zircônia, temos dois caminhos a seguir:

(1) Tentar desvendar os mecanismos biomoleculares que vão desencadear toda a sinalização para a atração de células osteoprogenitoras que darão início à deposição de tecido mineralizado sobre às superfícies dos implantes, ou

(2) Colocar células osteoprogenitoras em contato direto e indireto com superfícies de titânio e zircônia, para testar se somente esse contato seria suficiente para induzir a diferenciação celular, culminando com a secreção de matriz mineralizada, prescindindo de toda a cascata de sinalização dos neutrófilos. Assim, pareceu-nos mais lógico explorar a segunda opção. Se confirmada a hipótese do contato ser suficiente para a indução da mineralização e da osteointegração dos implantes, não há porque se buscar vias de indução pelos neutrófilos. Se confirmada a hipótese de não mineralização, teremos que buscar as vias de sinalização, para desvendar os mecanismos pós-traducionais desde os neutrófilos até os osteoblastos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

- Avaliar a resposta das células mesenquimais indiferenciadas quando em contato, direto e indireto, com diferentes superfícies de implantes, como titânio e zircônia.

3.2 Específicos:

- Avaliar a viabilidade indireta de células mesenquimais indiferenciadas após o contato com extratos obtidos das superfícies de titânio e zircônia;
- Avaliar a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas induzidas em osteoblastos-*simile*, após o contato com extratos obtidos das superfícies de titânio e zircônia em meio osteogênico;
- Aferir a indução de produção de matriz mineralizada sobre superfícies de titânio e zircônia, após incubação com células mesenquimais indiferenciadas em meio basal.

4. MATERIAIS e MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental

O objetivo do trabalho é testar as diferentes superfícies de implantes, e como células mesenquimais indiferenciadas reagem a essas superfícies. Assim sendo, foram idealizados 3 experimentos distintos, com 3 tipos de superfícies e 2 tipos de células mesenquimais indiferenciadas:

Discos:

Disco de Titânio com superfície idêntica aos dos implantes produzidos pela Peclab.

Disco de Zircônia com superfície Normal idêntica às superfícies dos implantes ZV3.

Discos de Zircônia com superfície tratada a ser usada em novos lançamentos da ZV3.

Células:

Células mesenquimais indiferenciadas de polpa dentária humana.

Células mesenquimais indiferenciadas de lipoaspirado humano.

➤ Caracterização Inicialmente, as amostras foram caracterizadas quanto a sua superfície e constituição atômica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com uso de EDS (espectroscopia eletrônica com difração de raio X).

➤ Ensaio I Ensaio *in vitro* de Viabilidade Celular pelo método de citotoxicidade indireta pelo agente de formação celular WST-1.

➤ Ensaio II Ensaio *in vitro* de Osteoindução a distância por detecção de Vermelho de Alizarina (marcador de diferenciação osteogênica): Células mesenquimais indiferenciadas de origem de polpa dentária humana em meio de diferenciação osteoblástica Human Mesenchymal Expansion Medium (HM) (Millipore - Merck) em contato com três diferentes tipos de superfícies (e em triplicata) .

➤ Ensaio III Ensaio *in vitro* de Osteoindução por contato: Células mesenquimais indiferenciadas de origem de lipoaspirado humano semeadas em meio DMEM-low glucose (DMEM=Dulbecco's Modified Eagle's Medium) sobre três diferentes superfícies (e em triplicata), para testar a indução osteogênica pelo simples contato.

4.1.1 Substratos

Foram utilizados três (3) tipos de amostras (substratos):

Discos de 5,5 mm de diâmetro por 3,0 mm de espessura com superfícies com tratamentos superficiais idênticos aos dos implantes que comercializam, forma especialmente fabricados para a presente pesquisa, fornecidos respectivamente por:

- ❖ Titânio - *PecLab* - indústria nacional de Implantes de Titânio (**Ti**), baseada em Belo Horizonte (MG), Brasil;
- ❖ Zircônia - *ZV3-Zircon Vision* - líder mundial na produção de implantes de zircônia, baseada em Wolfratshausen, Bavária (Alemanha), que enviou amostras da Zircônia com superfície Normal que já utilizam (**Zr-N**) e também com o novo tratamento superficial que pretendem lançar no mercado (**Zr**), modificação esta com o objetivo de potencializar a bioatividade (esse novo tratamento não foi divulgado, por ainda se tratar de “segredo industrial”).

4.1.2 Células

❖ Células Mesenquimais Indiferenciadas de Polpa Dental Humana

Células mesenquimais indiferenciadas provenientes de polpa dentária de terceiros molares humanos extraídos de voluntários adultos jovens (figs. 17 , 18 e 19):

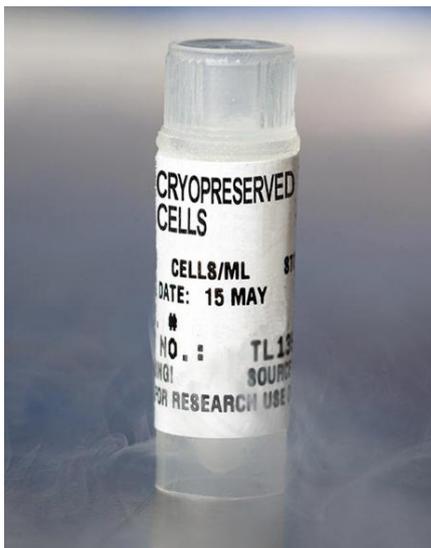


Fig.17 - Frasco de Células Mesenquimais Indiferenciadas de polpa dentária humana criopreservadas \geq 1 milhão de células. (LONZA, 2024)

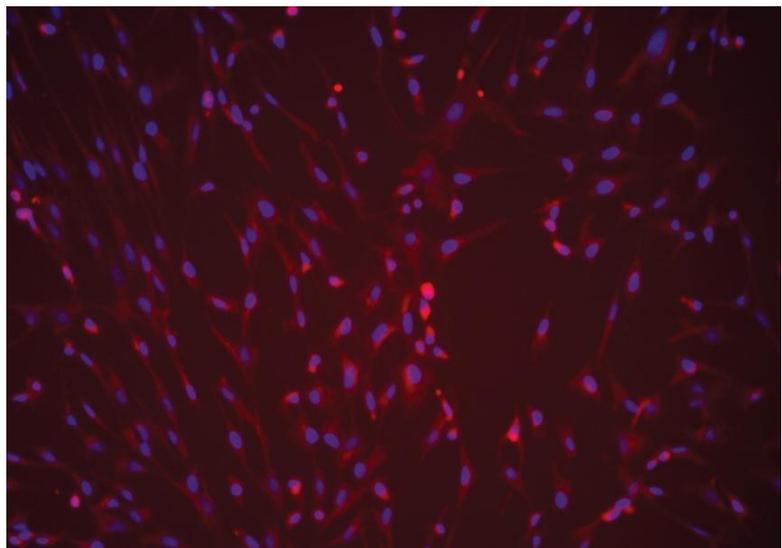


Fig. 18 - Células mesenquimais de polpa dental utilizadas na pesquisa, coradas em vermelho para sialoproteína de dentina (DSPP) e DAPI em azul, vistas em microscopia confocal.(LONZA, 2024)

As células-tronco da polpa dentária humana (DPSC) Poietics™ da Lonza são isoladas de terceiros molares adultos coletados durante a extração dos dentes do siso do doador (fig. 19). Estas células demonstraram características fenotípicas e funcionais muito semelhantes às células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. Relata-se que as células-tronco da polpa dentária humana (DPSC) podem se diferenciar em várias linhagens como condrogênica, osteogênica, adipogênica e neural. (LONZA-bioscience, 2024)

As células-tronco da polpa dentária humana (DPSC) foram criopreservadas na passagem primária, e o meio DPSC Dental Pulp Stem Cell BulletKit™ foi otimizado para a manutenção e expansão celular (fig. 17).

As células-tronco da polpa dentária criopreservadas Poietics™ (DPSC) são garantidas para, até 10 duplicações populacionais, expressarem CD105, CD166, CD29, CD90 e CD73, e não expressarem CD34, CD45 e CD133. Todas as células testam negativo para micoplasma, bactérias, leveduras e fungos. HIV-1, hepatite B e hepatite C não são detectados em nenhum dos doadores e/ou lotes de células. Um Certificado de Análise é fornecido para cada lote de células adquirido. (LONZA, 2024)



Fig. 19 - 3^{os} molares de adolescente. A) Coroa com marcas de sangue e cortes necessários para se remover o dente do interior do osso maxilar. B) O outro lado do dente mostra as raízes no início de sua formação, com ampla Polpa, repleta de células mesenquimais indiferenciadas. (Procedimento e foto realizados pelo autor)

❖ Células Mesenquimais Indiferenciadas de Lipoaspirado Humano

Serão descritas juntamente com os procedimentos do Ensaio III.

4.1.3 Reagentes

❖ Vermelho de Alizarina

O Vermelho de Alizarina (*Alizarin Red S* também conhecido como C.I. Mordant Red 3, Alizarin Carmine, e C.I 58005) (LILLIE, 1977) é um sal sódico do ácido de Alizarina sulfônica solúvel em água, de fórmula química $C_{14}H_7NaO_7S$ (LILLIE, 1977; LEGAN, 2016). Alizarin Red S foi descoberto por Graebe e Libermann em 1871 (LEGAN, 2016). No campo da histologia, o Alizarin Red S é usado para corar depósitos de cálcio nos tecidos, (PUCHTLER, 1969; BANCROFT, 1982) e em geologia para corar e diferenciar carbonatos minerais (PUCHTLER, 1969). Alizarin Red S é usado em histologia e histopatologia para corar ou localizar depósitos de cálcio nos tecidos (LILLIE, 1977; PUCHTLER, 1969; BANCROFT, 1982). Na presença de cálcio, o Vermelho de Alizarina S se liga ao cálcio, e forma um pigmento que tem a cor de laranja a vermelho. (BANCROFT, 1982)

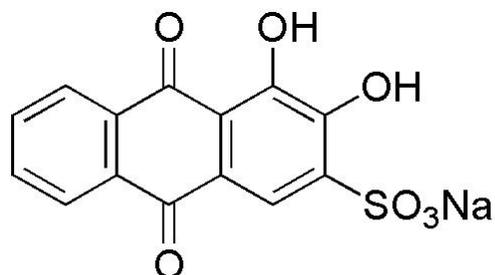


Fig. 20 - Estrutura química do Vermelho de Alizarina. Disponível em domínio público na Internet, em: https://en.wikipedia.org/wiki/Alizarin_Red_S#/media/File:Alizarin_Red_S.png

❖ Reagente de Proliferação Celular WST-1

O reagente WST-1 da Roche é um ensaio colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade e proliferação celular. É um sal de tetrazólio usado em biologia celular para medir a atividade metabólica das células.

➤ Princípio: O sal de tetrazólio estável WST-1 é clivado em formazano solúvel por um mecanismo celular complexo que ocorre principalmente na superfície celular. Esta

bio-redução depende em grande parte da produção glicolítica de NAD(P)H em células viáveis. Portanto, a quantidade de corante *formazan* formado está diretamente correlacionada com o número de células metabolicamente ativas na cultura.



Fig. 21 - Reagente de formação celular WST-1 (Roche)

As células cultivadas numa placa de cultura de tecidos de 96 poços são incubadas com o reagente WST-1 durante 0,5 - 4 horas. Após este período de incubação, o corante formazan formado é quantificado com um espectrofotômetro de varredura multipoços (leitor ELISA). A absorbância medida correlaciona-se diretamente com o número de células viáveis.

Os ensaios de proliferação e viabilidade celular são de particular importância para aplicações de rotina em biologia celular. Os sais de tetrazólio (por exemplo, MTT, XTT, WST-1) são particularmente úteis para este tipo de análise. Os sais de tetrazólio são clivados em formazan pelo sistema succinato-tetrazólio redutase (EC 1.3.99.1), que pertence à cadeia respiratória das mitocôndrias e só é ativo em células metabolicamente intactas. (THOMAS SCIENTIFIC, 2024; ROCHE Diagnostics GmbH, 2024)

➤ Mecanismo

O reagente WST-1 é convertido em um corante formazan solúvel em água por desidrogenases mitocondriais em células viáveis. Essa reação ocorre apenas em células metabolicamente ativas, tornando o ensaio um bom indicador da viabilidade celular. Quanto mais viáveis as células, mais corante formazan é produzido - diretamente proporcional - podendo ser quantificado medindo-se a absorbância do corante em um comprimento de onda específico, geralmente em torno de 450 nm.

➤ Aplicação

1. Ensaio de Viabilidade Celular: Para determinar o número de células viáveis em cultura, frequentemente usado em testes de drogas ou ensaios de citotoxicidade.

2. Ensaio de Proliferação Celular: Para monitorar o crescimento e a proliferação celular ao longo do tempo.

3. Teste de Citotoxicidade: Para avaliar os efeitos tóxicos de compostos em culturas celulares.

➤ Protocolo

1. Preparação do Reagente: Diluir o reagente WST-1 conforme as instruções do fabricante, tipicamente com meio de cultura.

2. Semeadura das Células: Semear as células em uma placa de 96 poços e permitir que adiram e cresçam até a confluência desejada.

3. Tratamento: Adicionar quaisquer tratamentos ou drogas a serem testados nos poços apropriados e incubar pelo período desejado.

4. Adição do Reagente WST-1: Adicionar o reagente WST-1 a cada poço (geralmente 10 μ L de WST-1 para 100 μ L de meio de cultura) e incubar por 1-4 horas a 37°C.

5. Medição: Medir a absorbância a 450 nm usando um leitor de microplacas. Um comprimento de onda de referência de 620 nm também pode ser usado para corrigir interferências de fundo.

➤ Vantagens

- Simples e Rápido: O ensaio é direto e não requer manuseio extensivo das células.

- Não Radioativo: Ao contrário de alguns outros ensaios de viabilidade, o WST-1 não usa substâncias radioativas.

- Alta Produtividade: Adequado para uso em triagens de alta produtividade devido à sua compatibilidade com placas de 96 poços.

➤ Considerações

- Tipo de Célula: A resposta ao WST-1 pode variar entre diferentes tipos de células.

- Tempo de Ensaio: Garantir que o tempo de incubação esteja otimizado para o seu tipo de célula específico e condições experimentais para evitar super ou subestimação da viabilidade celular.

- Poços de Controle: Sempre incluir poços de controle sem células (branco) e células não tratadas (controle positivo) para interpretar os resultados com precisão.

O ensaio WST-1 é uma ferramenta valiosa para pesquisadores em áreas como oncologia, farmacologia e toxicologia, fornecendo uma medida confiável da saúde e proliferação celular. (ISO, 2009; TAKAHASHI, 2009)

4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

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 de células, caracterizando sua superfície tanto no estado quiescente quanto no estado ativado (DA ROSA, E.L.S., 2012).

O elemento sob análise, recebe uma descarga de elétrons. O choque com esses elétrons, faz com que elétrons, das órbitas atômicas dos elementos da amostra, mudem de camada orbital. Nessa mudança, há emissão de Raio X, que é específico de cada elemento da Tabela Periódica. Assim, o detector de Raio X identifica qual o elemento químico que está sendo analisado pelo EDS do MEV, e cria um gráfico do espectro eletrônico de difração de raio X.

A análise da morfologia superficial dos substratos de titânio e zircônia foi realizada em um Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (microscópio JEOL JSM 7001, Japão) com uso de EDS (espectrógrafo de análise elementar por difração de raio X).

4.3 Ensaios Biológicos *in vitro*

O desenho experimental dos ensaios biológicos *in vitro* pode ser resumido pela resposta comportamental das células mesenquimais frente às três diferentes superfícies de implantes: Titânio, Zircônia Normal e Zircônia com tratamento especial de superfície.

4.3.1 Ensaio *in vitro* de Viabilidade Celular pelo método de citotoxicidade indireta

Para o ensaio de viabilidade celular pelo método de citotoxicidade indireta das amostras foram utilizadas as células tronco mesenquimais de polpa dentária (Lonza, PT-5025) cultivadas em frasco de cultura de células de 175 cm² utilizando o meio de cultura *Human Mesenchymal Expansion Medium* (HM) (Millipore - Merck) suplementado com 8% de soro humano (Sigma-Aldrich), 1% de antimicrobianos (Penicilina e Streptomicina, Sigma-Aldrich), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1% de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas em uma atmosfera com 5% de CO₂ a 37° C, com substituição do meio de cultura a cada 2 dias. As células foram destacadas do recipiente utilizando a enzima TrypLE™ Express (Gibco), quando evoluíram a, aproximadamente, 70-90% de confluência.

Em seguida, foram semeadas a uma densidade de células de 5 x 10⁴ células em uma placa de cultura de 96 poços, obtendo o volume final de 100µL/poço.

Para o teste de viabilidade celular, foram formados três grupos experimentais: Titânio (Ti), Zirconia (Zr) e Zirconia N (ZrN). Para a produção dos extratos utilizados neste ensaio, os grupos experimentais foram incubados nas mesmas condições das células, portanto, em meio de cultivo com uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C, em uma placa de 48 poços. Além disso, o ensaio foi realizado em triplicata (n = 3). Após um período de incubação de 24 h, 100µL dos extratos obtidos dos grupos experimentais foram transferidos para a placa de cultura de 96 poços. Para este estudo, foram avaliados dois tempos de exposição: 24 h e 48 h. Após estes tempos, para a obtenção dos resultados de viabilidade, foram adicionados 10µL de solução WST-1 (Roche) em cada poço e as células foram incubadas a 37° C em 5% de CO₂ durante 4 h. - Vide esquema do experimento na figura 23.

O reagente de proliferação celular WST-1 é usado para a quantificação espectrofotométrica não radioativa da proliferação e viabilidade celular em populações celulares usando o formato de placa de 96 poços. Medição da proliferação celular em resposta a fatores de crescimento, citocinas, mitógenos e nutrientes.

Após o período de incubação de 4 h, as amostras foram agitadas suavemente, durante 1 minuto e a absorbância foi medida a 450 nm por um Espectrofotômetro (leitor de microplacas Promega, Glomax E8032). Como controles para o ensaio de cultura colorimétrico, o meio de cultura contendo WST-1 sem células foi utilizado para definir o limiar de fundo, enquanto o meio de cultura contendo WST-1 com células foi utilizado como controle da viabilidade celular. A viabilidade celular (%) foi calculada com a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância (teste)} - \text{Absorbância (branco)} \times 100\%}{\text{Absorbância (controle positivo)} - \text{Absorbância (branco)}}$$



Fig. 22 - Espectrofotômetro Promega Glomax E8032

Para a análise estatística, foi utilizado o *Python*¹ com a biblioteca *SciPy*², utilizando especificamente seu módulo *scipy.stats* para executar a Análise de Variância (ANOVA) de uma via. Esta metodologia foi selecionada para determinar diferenças estatisticamente significativas entre as médias de viabilidade celular dos grupos experimentais - T, Zr e ZrN - comparadas ao grupo controle (células), com um nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. A utilização dessas ferramentas de código aberto e bem documentadas assegura a confiabilidade, precisão e reprodutibilidade dos resultados.

Os testes de viabilidade celular foram realizados em colaboração com o Departamento de Bioengenharia do R-Crio Células Tronco, em Campinas, São Paulo.

¹ statistics — Mathematical statistics functions: <https://docs.python.org/3/library/statistics.html>

² Fundamental algorithms: <https://scipy.org/>

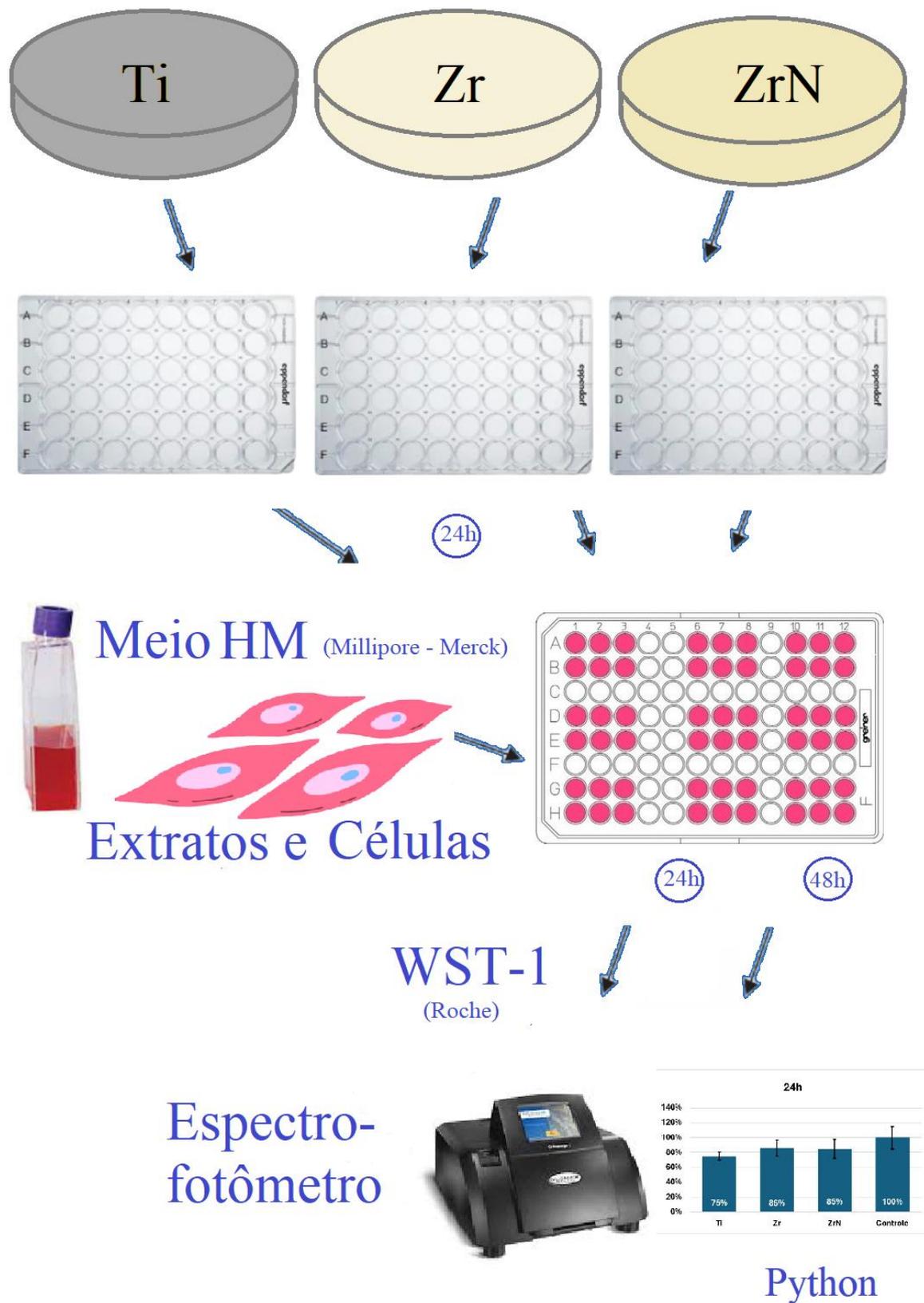


Fig. 23 - Ensaio I - Ensaio de Viabilidade celular com células mesenquimais de polpa dental humana em meio de cultivo HM (Milipore-Merck), e extratos das superfícies de Titânio, Zircônia Normal e Zircônia com tratamento especial de superfície.

4.3.2 Ensaio *in vitro* de Osteoindução a distância

Acredita-se que a principal força motriz da osseointegração em implantes dentários e ortopédicos seja a deposição óssea, como consequência da atividade celular. Para o ensaio de osteoindução à distância *in vitro*, foram utilizadas células tronco mesenquimais de polpa dentária (Lonza, PT-5025), cultivadas em placas de cultura de 12 poços, empregando meio de cultura Human Mesenchymal Expansion Medium (HM) (Millipore - Merck) suplementado com 8% de soro humano (Sigma-Aldrich), 1% de antimicrobianos (Penicilina e Streptomicina, Sigma-Aldrich), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1% de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas em uma atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C até que atingiram aproximadamente 70-90% de confluência em 3 dias de cultivo para início do ensaio. Veja a figura 24, a seguir.

Os extratos dos materiais dos grupos experimentais: Ti, Zr e ZrN, foram preparados incubando os materiais nas mesmas condições das células durante todo o tempo do ensaio. Para o teste de osteoindução, foram formados três grupos experimentais e os extratos foram coletados durante as trocas de meio de cultura a cada 3-4 dias. Estes extratos foram então transferidos para uma placa de cultura de 12 poços, onde células foram previamente semeadas a uma densidade de 5×10^4 células por poço, com volume final de 1 mL/poço.

Para a análise de osteoindução, foram avaliados dois tempos de exposição: 7 dias e 14 dias. Após estes períodos, a avaliação foi realizada utilizando microscopia óptica invertida (Primovert Trinocular, Zeiss) para examinar a morfologia celular e a coloração após vermelho de alizarina, que indica a presença de depósitos de mineralização. Como controle do ensaio, foram utilizadas amostras com células em meio de cultura sem extratos dos materiais (discos).

Este modelo de ensaio *in vitro* de osteoindução à distância tem o intuito da investigação das propriedades osteoindutivas de diferentes materiais de implante, fornecendo uma abordagem valiosa para a regeneração óssea no campo da odontologia e ortopedia.

Os ensaios foram realizados em colaboração com o Departamento de Bioengenharia do R-Crio Células Tronco, em Campinas, São Paulo.

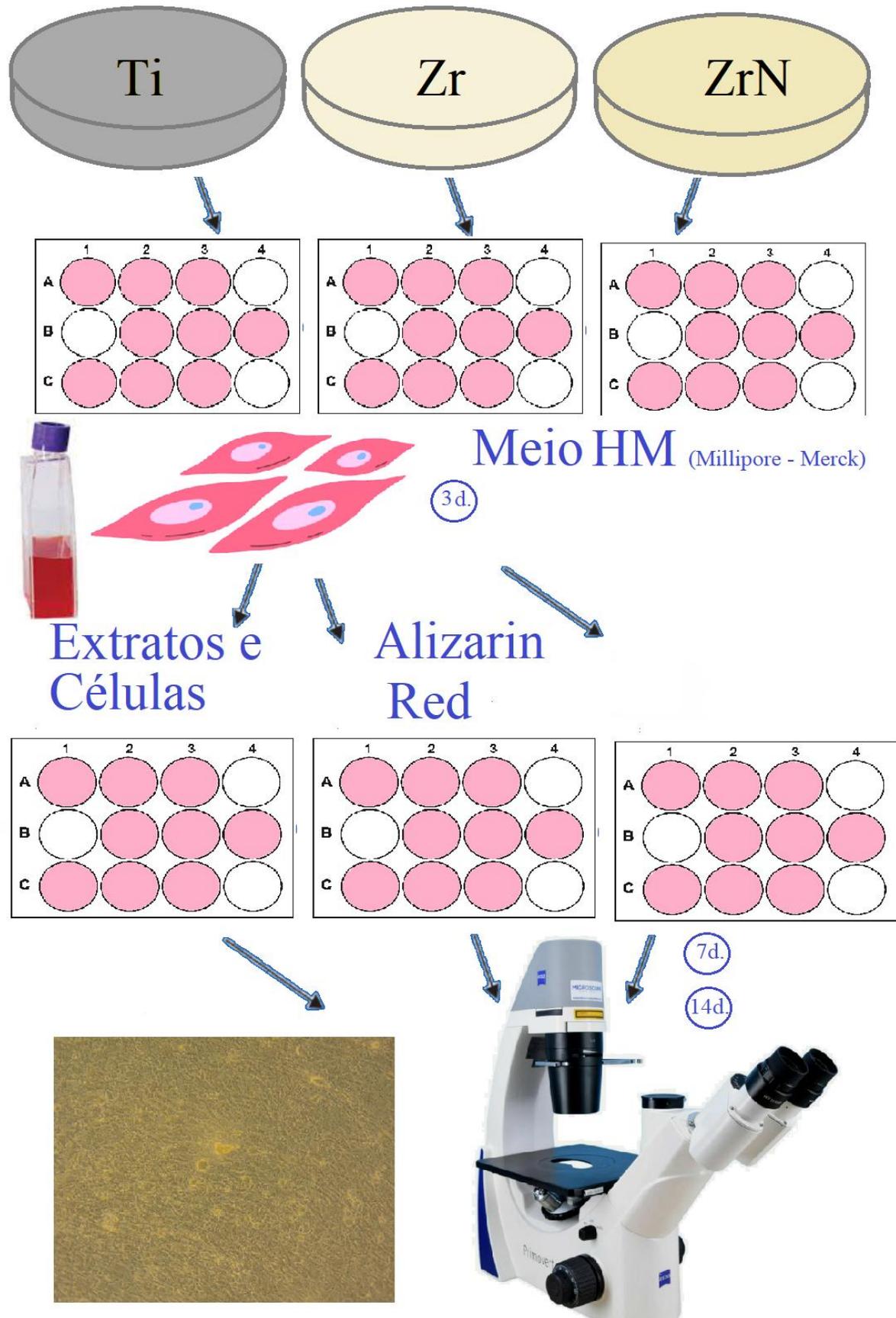


Fig. 24 - Ensaio II - Células mesenquimais indiferenciadas de Polpa Dental Humana cultivadas em Meio de Diferenciação Osteoblástica (HM). Exame ao microscópio óptico para aferição do marcador de diferenciação osteoblástica Vermelho de Alizarina.

4.3.3 Ensaio *in vitro* de Osteoindução por contato

Para o ensaio de osteoindução por contato *in vitro*, foram utilizadas células-tronco mesenquimais indiferenciadas extraídas de lipoaspirado humano, cultivadas em placas de cultura de 96 poços (Kasvi, China). As células foram semeadas sobre os grupos experimentais: discos de Titânio (Ti), Zircônia (Zr), Zircônia com tratamento especial (ZrS), tampinhas de Eppendorf (controle negativo - Epp) e discos de papel (celulose - Pa). As células foram contadas em câmara de Neubauer, chegando-se ao cálculo de 370 células por mL, e um volume de 3 mL por poço, com aproximadamente 1.000 células em cada poço. E nesses poços com mil células foram depositados os discos dos substratos a serem testados.

Para a avaliação da indução da diferenciação osteogênica, as células foram incubadas em contato com as diferentes superfícies durante 21 dias. Após esse período, as amostras foram fixadas, metalizadas e examinadas sob microscopia eletrônica de varredura para avaliar qualitativamente algum sinal de deposição óssea sobre os discos. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada com o intuito de análise detalhada da possível deposição de matriz mineralizada, indicando a capacidade osteoindutiva dos materiais testados. Veja a figura 25.

Foram obtidas células mesenquimais de tecido adiposo, após a coleta de lipoaspiração de pacientes voluntárias que foram submetidas a procedimentos estéticos seletivos de lipoaspiração. Todas com maioridade civil, e que não se enquadraram em nenhum critério de exclusão, e que assinaram o Termo de Consentimento Informado.

A prática de extração de células mesenquimais indiferenciadas da fração adiposa estromal tem fornecido 5.000 células-tronco por grama de tecido adiposo. Ou seja, é uma fonte tão boa, senão melhor que a medula óssea (PEDRAZZI, 2020).

A coleta foi feita pela técnica de lipoaspiração tumescente, a qual consiste na aspiração de tecido adiposo subcutâneo, após injeção de solução anestésica diluída e com vasoconstritor.

O transporte do lipoaspirado até a Sala de Cultivo do Laboratório de Microscopia e Microanálise do IB-UnB foi feito em seringas grandes de aspiração segundo normas validadas de transporte de material biológico.

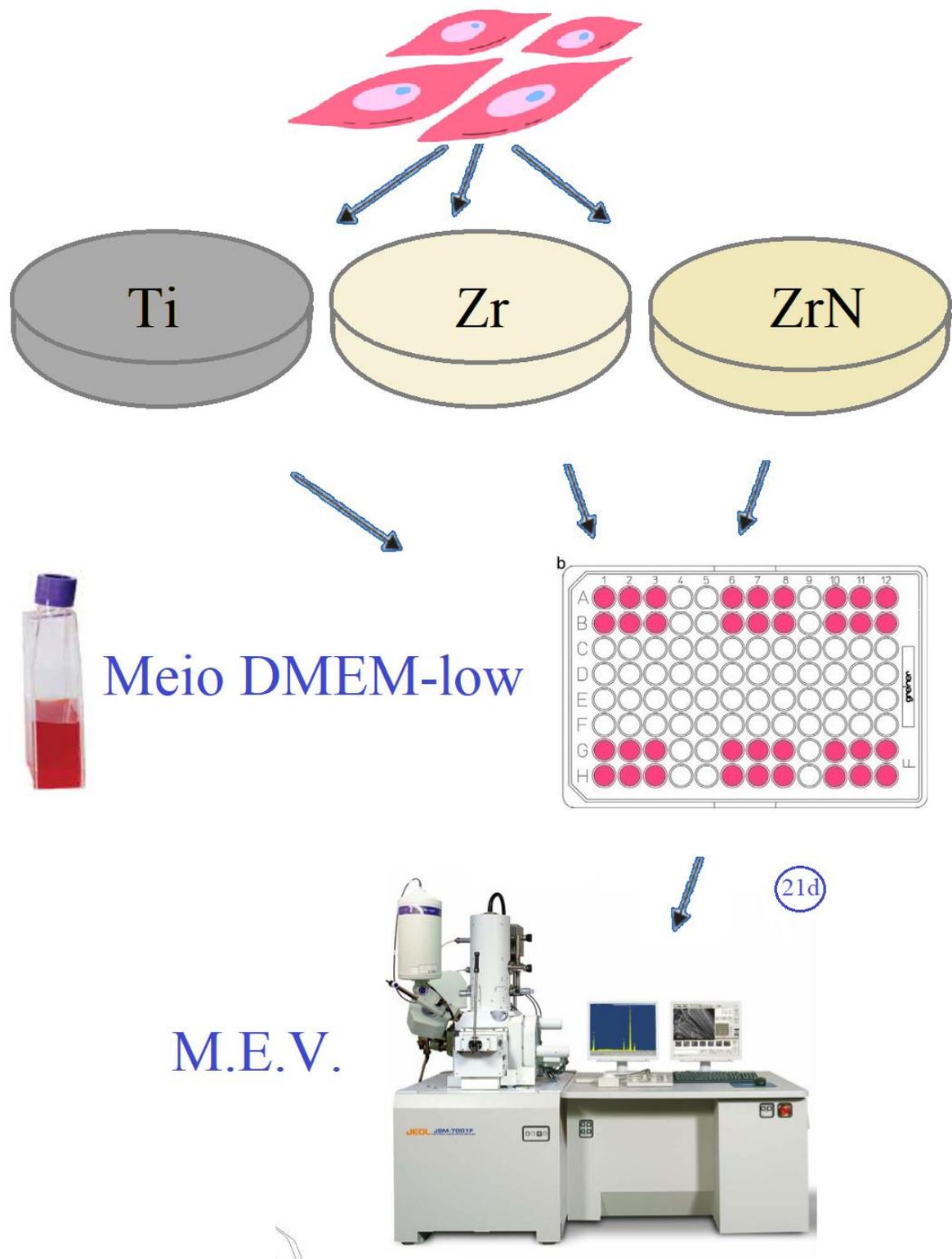


Fig. 25 - Ensaio III - Células mesenquimais de lipoaspirado cultivadas em Meio DMEM-low sob os discos nas 3 diferentes condições, e avaliadas sob Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As seringas foram levadas à cabine de fluxo laminar (cabine de segurança biológica)(Ver Figs. 26 e 27), onde foram transferidas para tubos Falcon com tripsina, e centrifugadas a 3.000 rpm por 3 minutos, para se separar a fração lipídica.

Para se calcular a Força Gravitacional “g” empregada na centrífuga, usa-se a seguinte fórmula:

$$\text{Força } g = \frac{(\text{Rotações Por Minuto})^2 \times \text{raio do Rotor (em cm.)}}{918}$$

Onde a força Gravitacional é igual à Rotação elevada ao quadrado, multiplicada pelo Raio do Rotor (em centímetros) e dividida por 918.

A Força g aumenta quadraticamente com a velocidade(rpm), e diretamente com o comprimento do raio do rotor. A força g diminui, à medida que o raio do rotor diminui.

RCF também é uma medida de força gravitacional “g” , significa Força Centrífuga Relativa, em inglês, *relative centrifugal force*. É uma medida de força exercida pela centrífuga sobre as partículas (ou células) em suspensão. É um valor adimensional que representa a força centrífuga em relação à força de gravidade. Expressa a força “g” em termos de múltiplos da força da gravidade. O RCF indica quantas vezes a centrífuga está exercendo a força da gravidade naquela velocidade.

No caso do experimento, significa que o aparelho está exercendo uma força centrífuga equivalente a 302 vezes a força da gravidade (g) na velocidade de 1500 RPM.

Querendo calcular a força “g” (em unidades g) a partir da RCF, pode-se usar a fórmula seguinte:

$$\text{Força } g \text{ (em g)} = \text{RCF} \times g$$

Onde g é a aceleração devido à gravidade (aproximadamente $9,8 \text{ m/s}^2$)

No caso do experimento em questão, a 1500 rpm , a RCF foi de 302 . Então,

$$\text{Força } g = 302 \times 9,8 = 2959 \text{ g}$$

É importante notar que o RCF depende da velocidade de rotação (RPM) e do raio do rotor, por isso é uma medida específica para cada configuração da centrífuga (RICKWOOD, 1990; McCARTY, J.M., 1995).

Voltando ao experimento, após a centrifugação (centrífuga Kasvi K14-4000), o sobrenadante lipídico foi descartado, o botão celular (*pellet*) resultante foi ressuspendido e semeado em frascos para cultivo em meio *Dulbecco`s Modified Eagle Medium* - DMEM Low glucose (Frascos para Cultivo Celular Kasvi K11 1250. China), e colocadas em estufa incubadora Thermo Scientific (Forma Direct Heat 184 L.) a 37°C com 5,0 % de CO_2 .

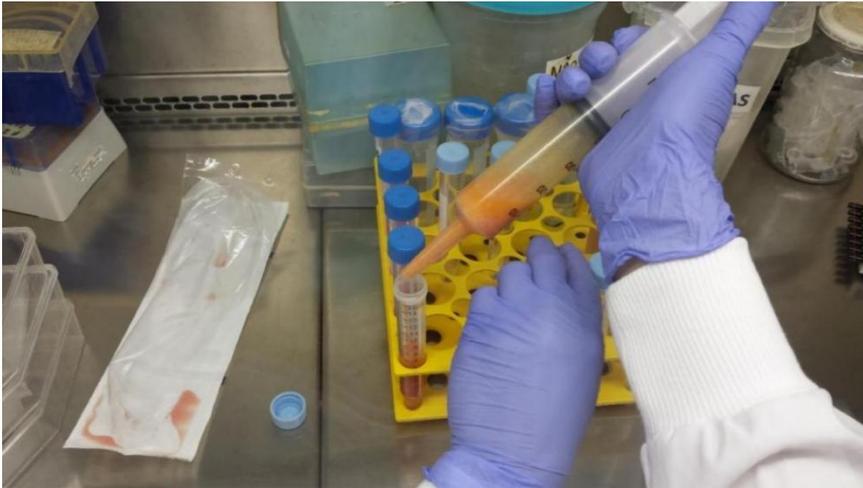


Fig. 26 - Lipoaspirado sendo acondicionado em tubos Falcon com tripsina para centrifugação.



Fig. 27 - O sobrenadante lipídico é descartado, e é feita nova centrifugação, para se separarem as células.

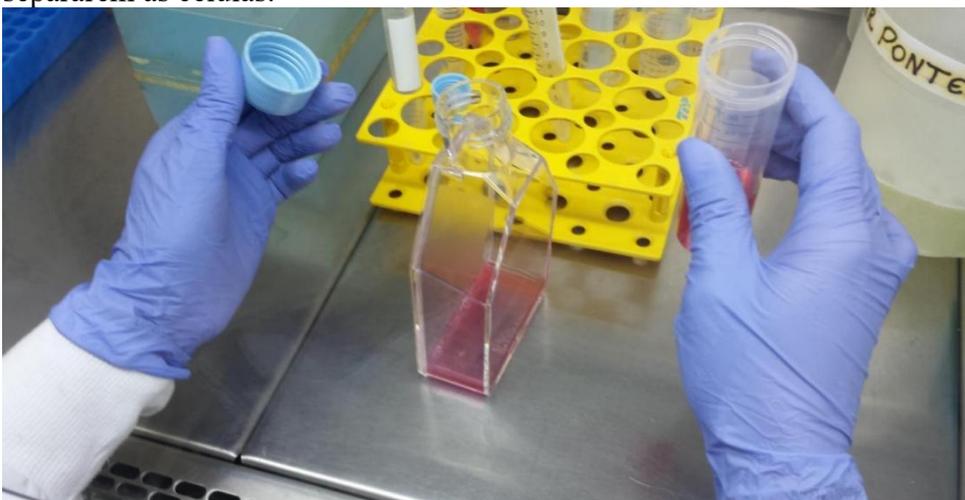


Fig. 28 - Após nova centrifugação a 3.000 rpm (124 g) por 3 min.(centrífuga Kasvi K14-4000), o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em DMEM e colocado em frasco de cultivo celular. Os frascos foram para estufa a 37° C com 5% de CO₂. Após 48 h., o frasco foi lavado com PBS (tampão salino fosfatado), para remoção de células não aderidas, hemácias e outros contaminantes.



Expansão das células extraídas do lipoaspirado humano:

Na Passagem 2, as células foram acondicionadas em frasco menor, para permitir maior comunicação e sinalização bioquímica entre as células, uma vez que foi notado uma dificuldade de crescimento, possivelmente por terem sido extraídas para um franco demasiadamente grande, para o número de células conseguido (Fig. 28 , acima).

Atingido o ponto de confluência de 75%, na Passagem 4 as células foram divididas em 2 frascos.

Fig. 29 - Microfotografia das células em frasco de cultivo, confirmando a adesão nas paredes do frasco e células de formato fusiforme.

Na Passagem de número 5, as células foram divididas em 2 sub-populações, e uma delas congelada a -75°C , para se fazer um estoque, enquanto a outra foi para o experimento.

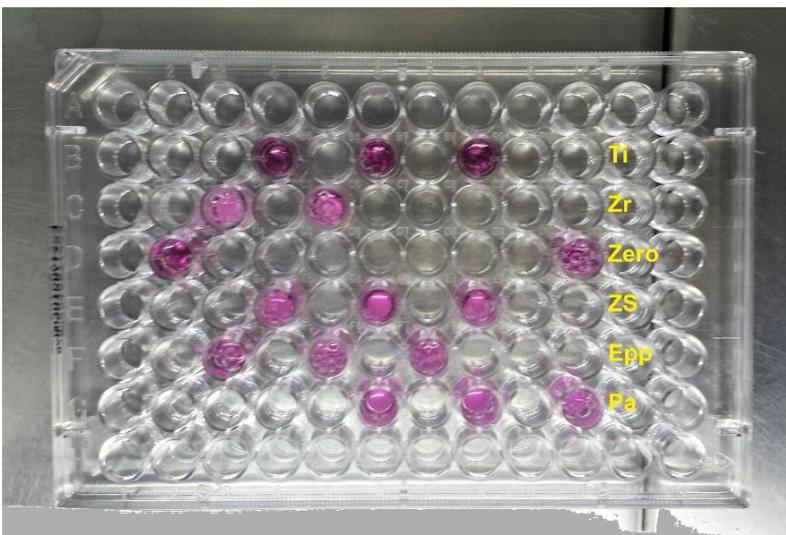


Fig. 30 - Células Mesenquimais Estromais Indiferenciadas extraídas de Lipoaspirado incubadas em Placa de Cultivo de 96 poços com condições em triplicata: Ti=Titânio; Zr= Zircônia comum; ZSint=Zircônia Sinterizada(N); Zero=Branco(só meio de cultivo); Epp=tampas de Eppendorf/Controle Negativo; Pa=Discos de celulose/papel.

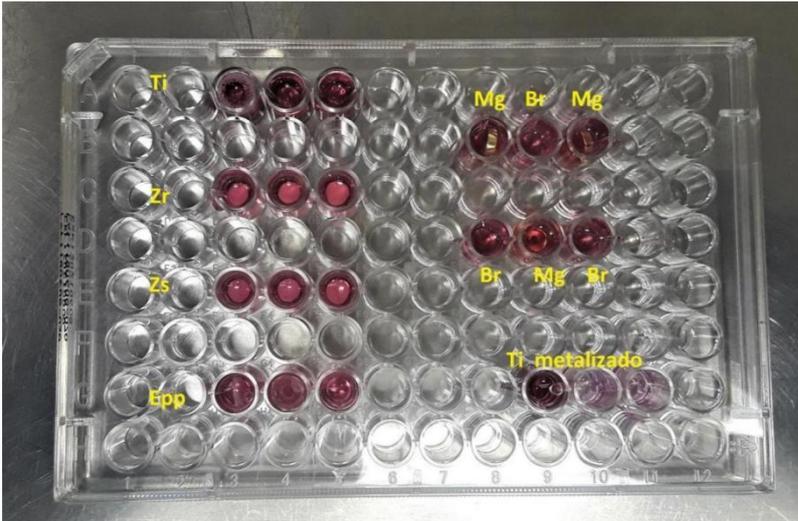


Fig. 31 - Células Mesenquimais Estromais Indiferenciadas extraídas de Lipoaspirado incubadas em DMEM low-glucose, e as seguintes condições na Placa de 96 poços: Ti=Titânio ; Zr=Zircônia comum ; Zs=Zircônia especial ; Epp= Discos de tampas de Eppendorf (controle Negativo) ; Br=Poços em branco (sem disco=controle Negativo) ; Mg=Discos Magnéticos ; Ti metalizado=Disco de titânio metalizado com Au.

Os ensaios foram realizados no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (IB-UnB).

5. RESULTADOS

5.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

5.1.1 - Discos de Titânio – liga de grau IV – $TiAl_6V_2$ com superfícies *Peclab* :

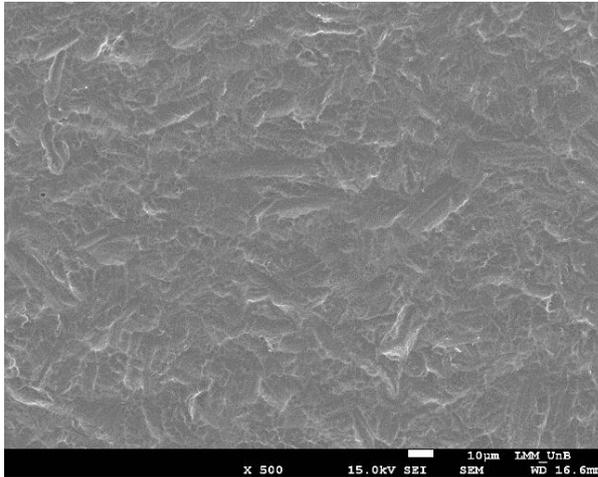


Fig. 32 - Superfície de disco de Titânio(Ti) sob Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) 500x de aumento.

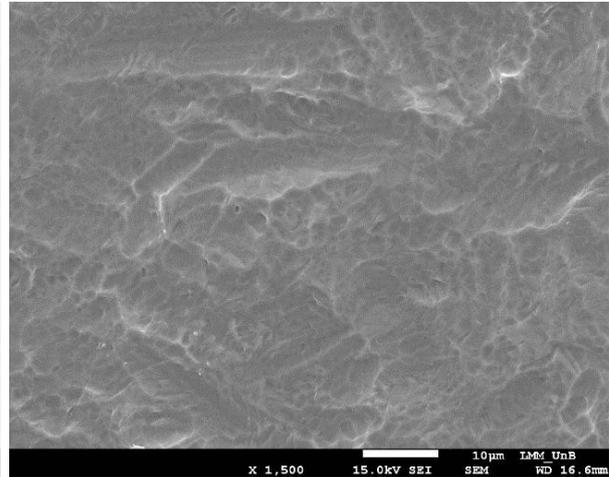


Fig. 33 - Superfície disco de Titânio(Ti) sob Microscópio MEV com 1.500 x de aumento.

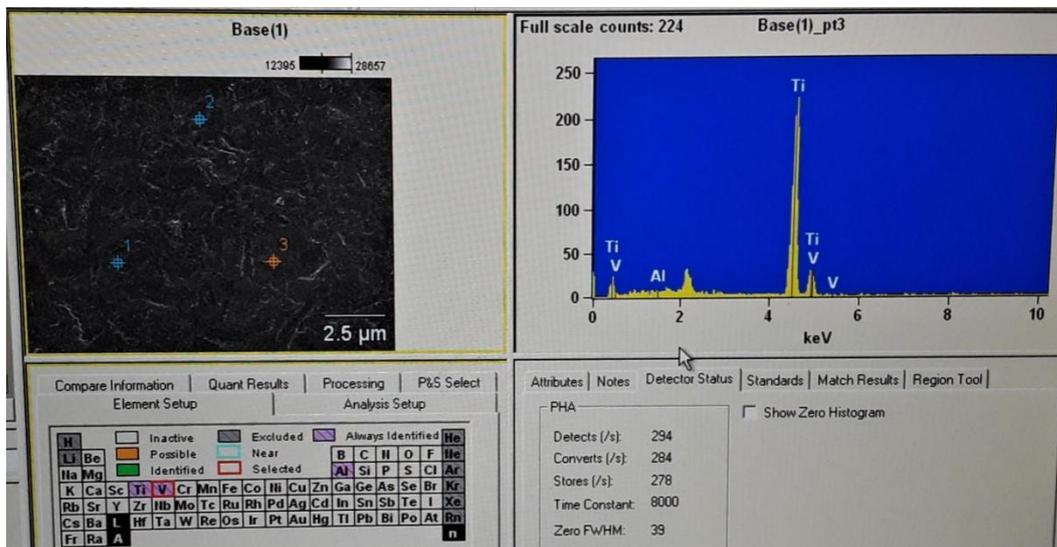


Fig. 34 - EDS da amostra de Titânio(Ti), mostrando os três pontos tomados ao aumento de 500 X, dando como resultado um Titânio de Grau IV de alta pureza (sem traços de contaminantes).

As superfícies observadas tanto em 500 como 1500 vezes de aumento mostram superfícies pouco acidentadas, como se tivessem sido somente torneadas - Fig. 33 , e depois limpas com ácido, sem um efetivo tratamento por jato de óxido de alumínio ou laser, por exemplo. As imagens são mais compatíveis com jateamento por esferas de vidro. Seria interessante um tratamento um pouco mais agressivo, com o intuito de tornar a superfície

mais rugosa, como já descrito como sendo mais favorável à osteointegração (OLIVARES-NAVARRETE, 2010; FEDOROV, 2013; GITTENS, 2013, CHOPRA, 2024).

Osteoblastos cultivados sobre superfícies micro-estruturadas sofrem influências de fatores que agem como moduladores de osteoblastos por via autócrina e parácrina. As superfícies de titânio micro-texturizadas por tratamento ácido + jateamento (SLA) induzem a maturação de osteoblastos, mesmo com silenciamento da via canônica Wnt e do fator de diferenciação Dkk2 (OLIVARES-NAVARRETE, 2010).

Os exames elementais de EDS do Microscópio Eletrônico de Varredura - MEV – das amostras (discos de titânio) revelaram uma composição química - figura 34 - de titânio de alta pureza, ou seja, sem traços contaminantes. Somente titânio, vanádio e alumínio.

5. 1.2 - Discos de Zircônia com superfícies idênticas aos implantes ZV3:

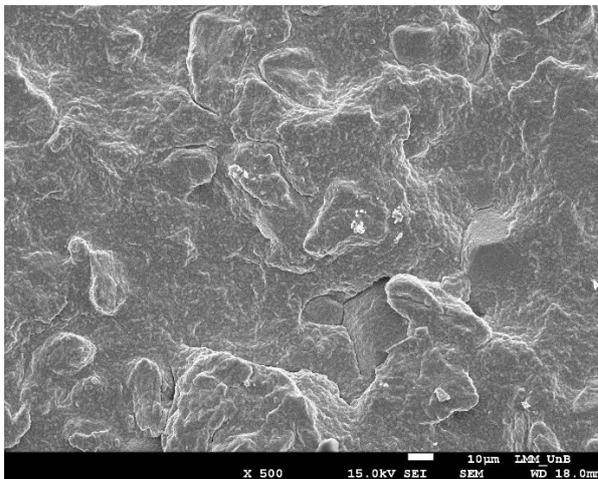


Fig. 35 - Superfície de disco de Zircônia com tratamento especial sob MEV 500 x aumento.

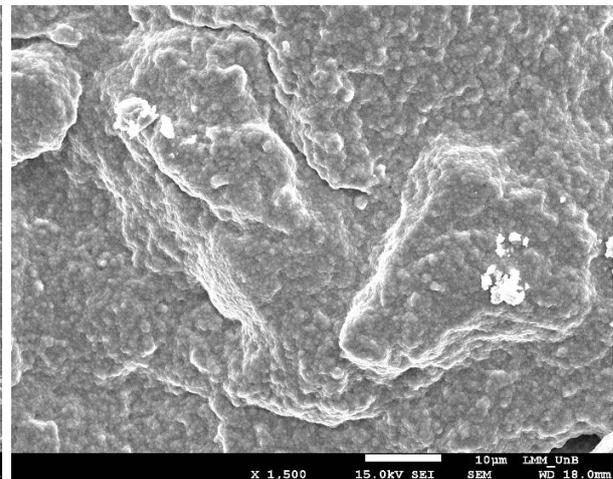


Fig. 36 - Superfície de disco de Zircônia com tratamento especial sob MEV a 1.500 x aumento.

Nas microfotografias 35 e 36 vemos características granulares, compatível com superfície de zircônia e algumas saliências irregulares, possivelmente causadas pelo tratamento que a indústria dá a essa superfície. As irregularidades auxiliam a ancoragem de osteoblastos e favorecem a osteointegração. Já as microfotografias nas figuras 37 e 38 das amostras da superfície Normal dos implantes de zircônia revelam topografia mais acidentada que as superfícies que receberam tratamento especial. Possivelmente, essas superfícies tenham melhor desempenho do que as tratadas (OLIVARES-NAVARRETE, 2010; GITTENS, 2013; CHOPRA, 2022), o que pode ser comprovado por testes biológicos com osteoblastos.

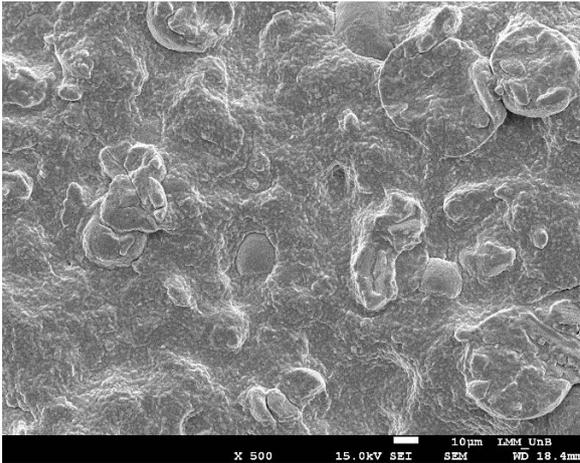


Fig.37 - Disco de Zircônia com tratamento superficial normal (ZrN) sob MEV com ampliação de 500 x.

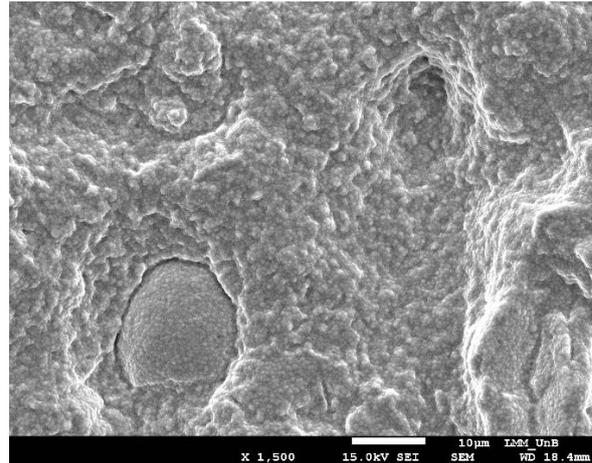


Fig.38 - Disco de Zircônia com tratamento superficial normal (ZrN) sob MEV com ampliação de 1.500 x.

Os exames elementais de EDS do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) das amostra de Zircônia (Zr e ZrN), mostrando os três pontos tomados ao aumento de 500 X, dando como resultado uma Zircônia de alta pureza (sem traços de contaminantes) (Fig. 39):

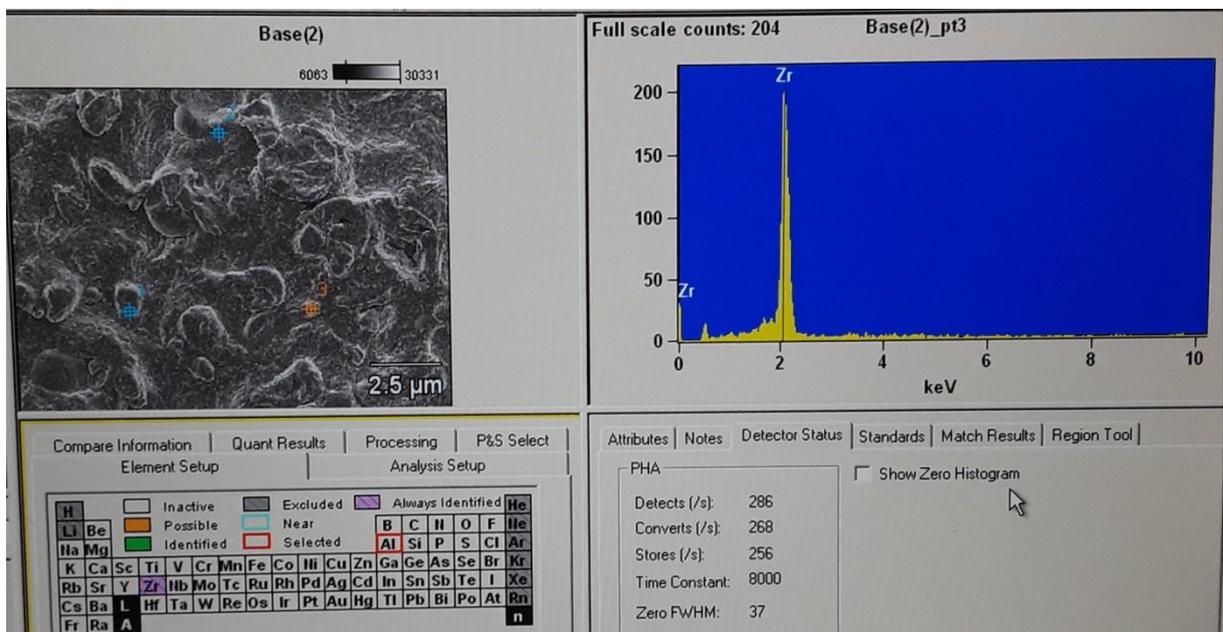


Fig. 39 - EDS da amostra 1 de Zircônia normal (ZrN), mostrando os três pontos tomados ao aumento de 500 X, dando como resultado uma zircônia de alta pureza.

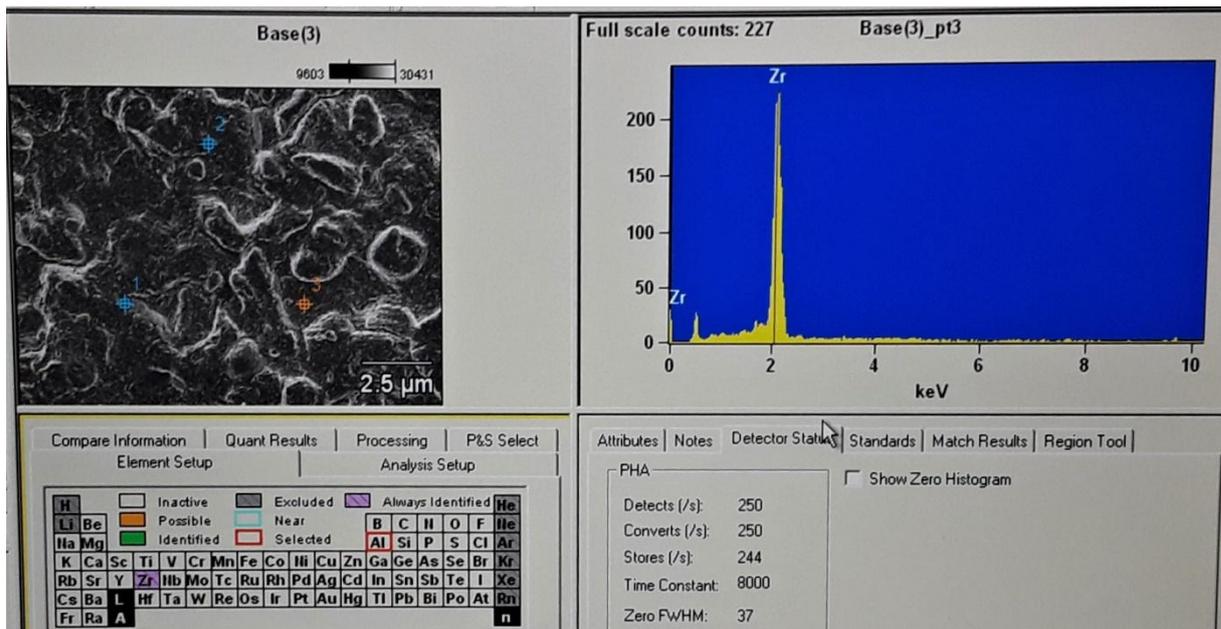


Fig. 40 - EDS da amostra 2 de Zircônia (Zr com tratamento), mostrando os três pontos tomados ao aumento de 500 X, dando como resultado uma zircônia de alta pureza.

5.2 Resultados dos ensaios Viabilidade Celular por citotoxicidade indireta com células mesenquimais indiferenciadas extraídas de polpa dentária humana - Em Meio de Cultivo Basal (HMedium).

A citotoxicidade dos extratos obtidos a partir dos substratos metálicos em contato com o meio de cultivo foi analisada por via indireta, a partir da exposição dessas células em 24 e 48h. aos extratos obtidos (vide figura 23)

De acordo com o padrão ISO 10993-5 (International Organization for Standardization, 2009), pode-se inferir que os substratos dos grupos Ti, Zr e ZrN não afetaram de maneira expressiva o crescimento celular, quando expostos ao extrato de 24h e 48h, indicando crescimento celular - Vide figura 41, a seguir .

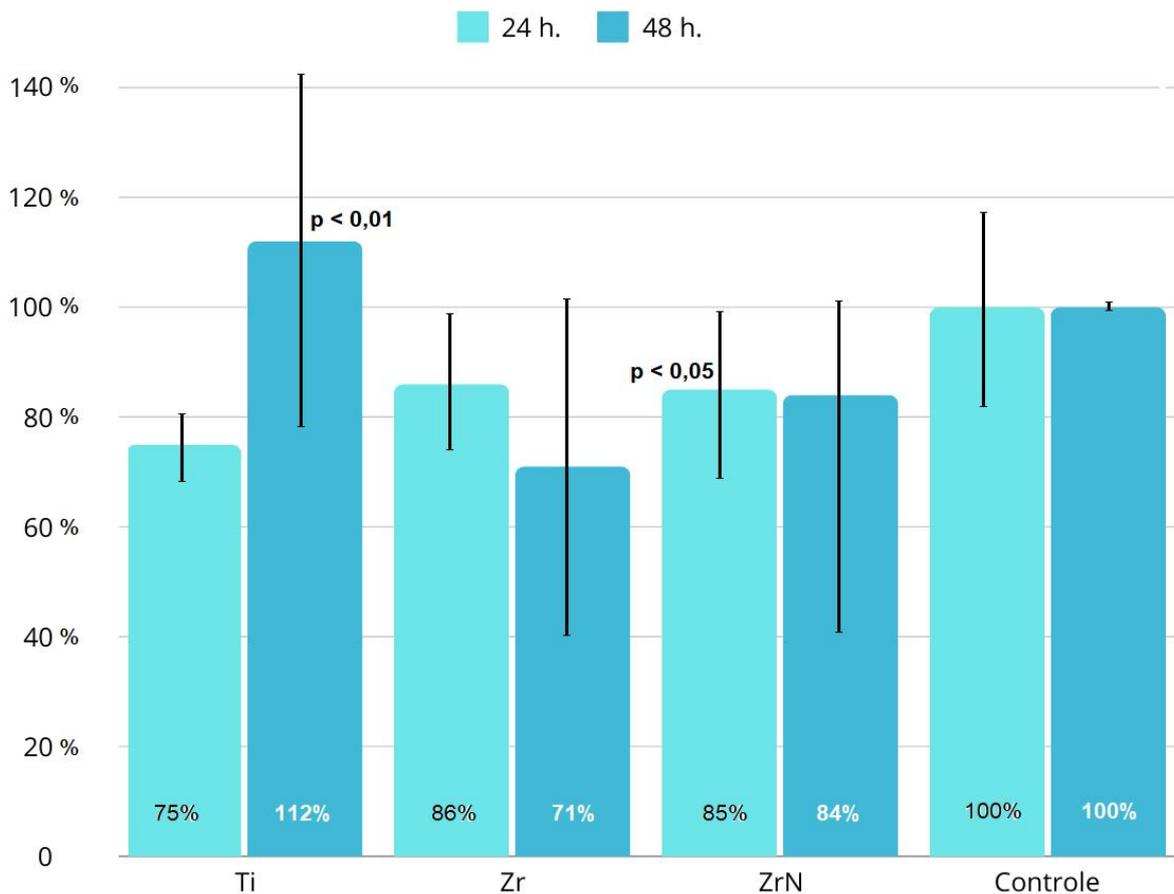


Fig. 41 - Viabilidade celular. Após 24h: grupo ZrN apresentou maior viabilidade em relação ao grupo Ti ($p < 0,05$). Após 48h: grupo Ti apresentou maior viabilidade em relação aos grupos Zr e ZrN ($p < 0,01$).

Para os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade de 24 horas (Fig. 41), conduzido com o intuito de avaliar a biocompatibilidade *in vitro* de diferentes materiais utilizados em implantes, observou-se que todos os grupos experimentais apresentaram viabilidade celular, indicando baixa citotoxicidade frente às células tronco mesenquimais. O grupo Ti demonstrou 75% de viabilidade, enquanto os grupos Zr e ZrN demonstraram uma viabilidade ligeiramente superior, com 86% e 85%, respectivamente. Notavelmente, nenhum dos materiais testados alcançou a viabilidade celular do controle, que exibiu 100%, servindo como parâmetro ideal de viabilidade. Esses resultados sugerem que, embora haja uma pequena redução na viabilidade celular em presença dos extratos dos materiais de implante em comparação com o controle, os percentuais elevados de viabilidade indicam uma boa compatibilidade celular após 24 horas de exposição.

A análise dos resultados do ensaio de viabilidade celular após 24h revelou que o grupo ZrN apresentou diferença estatística significativa na viabilidade celular em relação ao grupo Ti ($p < 0,05$). Embora a diferença na viabilidade celular entre esses grupos não seja tão evidente, este resultado sugere que o tratamento feito com ZrN pode ter um efeito positivo na viabilidade celular após 24h, em comparação com o grupo experimental Ti - Ver fig. 41 .

Ao analisar os resultados do ensaio de viabilidade celular pelo método de citotoxicidade indireta após 48 horas, apresentados na Fig. 41, observa-se um panorama diferenciado em relação ao intervalo anterior de 24 horas. O grupo Ti exibiu uma viabilidade celular notavelmente elevada, alcançando 112%, quando comparado ao grupo controle (100%). Por outro lado, o grupo Zr demonstrou uma redução significativa na viabilidade, com 71%, sugerindo uma menor viabilidade ao longo do tempo estendido de exposição para 48h. Para o grupo ZrN, uma viabilidade de 84% foi observada, mantendo-se mais próximo ao valor do grupo controle. As barras de erro ilustram a variabilidade nos resultados, que podem ser atribuídas a heterogeneidades intrínsecas das amostras ou das condições experimentais. Esses achados indicam que a resposta celular aos diferentes materiais pode variar não apenas em função da composição dos implantes, mas também em relação à duração da exposição no ensaio, ressaltando a complexidade inerente aos processos de biocompatibilidade *in vitro*.

Estes resultados também sugerem a necessidade de uma análise mais profunda da interação célula-extrato do material para entender as dinâmicas celulares e a viabilidade a longo prazo, pontos cruciais para o sucesso dos implantes dentários e ortopédicos.

No ensaio de citotoxicidade indireta após 48h, o grupo Ti apresentou diferenças estatísticas significativas na viabilidade celular em relação aos grupos Zr e ZrN ($p < 0,05$). Estas diferenças apresentaram-se maiores do que no ensaio de 24h, sugerindo que os efeitos dos extratos do grupo Ti se tornam evidentes com o tempo de incubação. Os resultados indicam que os extratos do grupo Ti podem ter um efeito positivo na viabilidade celular após 48h, quando em comparação com o grupo Zr e ZrN.

5.3 Resultados dos Ensaios de Osteoindução a distância com células mesenquimais indiferenciadas extraídas de polpa dentária humana - em Meio de Cultivo Osteogênico (HMedium).

Neste ensaio *in vitro* de osteoindução à distância, foram observadas respostas variadas em relação à capacidade osteoindutiva dos materiais de implante. As células tronco mesenquimais de polpa dentária **sem** a presença de extratos, utilizadas como grupo **controle** cultivadas em meio osteogênico, exibiram sinais de diferenciação osteogênica já com 7 dias de ensaio, conforme indicado pela presença de coloração após o uso do Vermelho de Alizarina (Fig. 42).

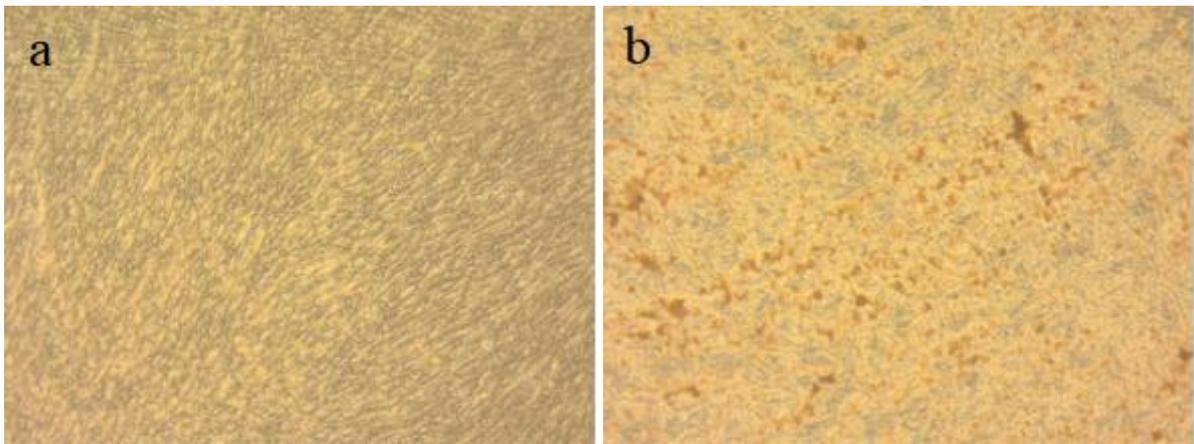


Fig. 42 - Grupo Controle Positivo. As células tronco mesenquimais de polpa dentária sem a presença de extratos, cultivadas em meio osteogênico, exibiram sinais de diferenciação osteogênica já com 7 dias de ensaio, conforme indicado pela presença de coloração após o uso do Vermelho de Alizarina : (a) poço controle, sem meio de diferenciação; (b) poço com células diferenciadas, cultivadas em meio de diferenciação osteogênica, após 7 dias. Fotos em objetiva 10x do microscópio óptico invertido (Primovert Trinocular, Zeiss).

Em um intervalo de tempo estendido para 14 dias, os extratos dos grupos experimentais Ti e ZrN apresentaram resultados positivos, demonstrando coloração semelhante ao controle (Fig. 43).

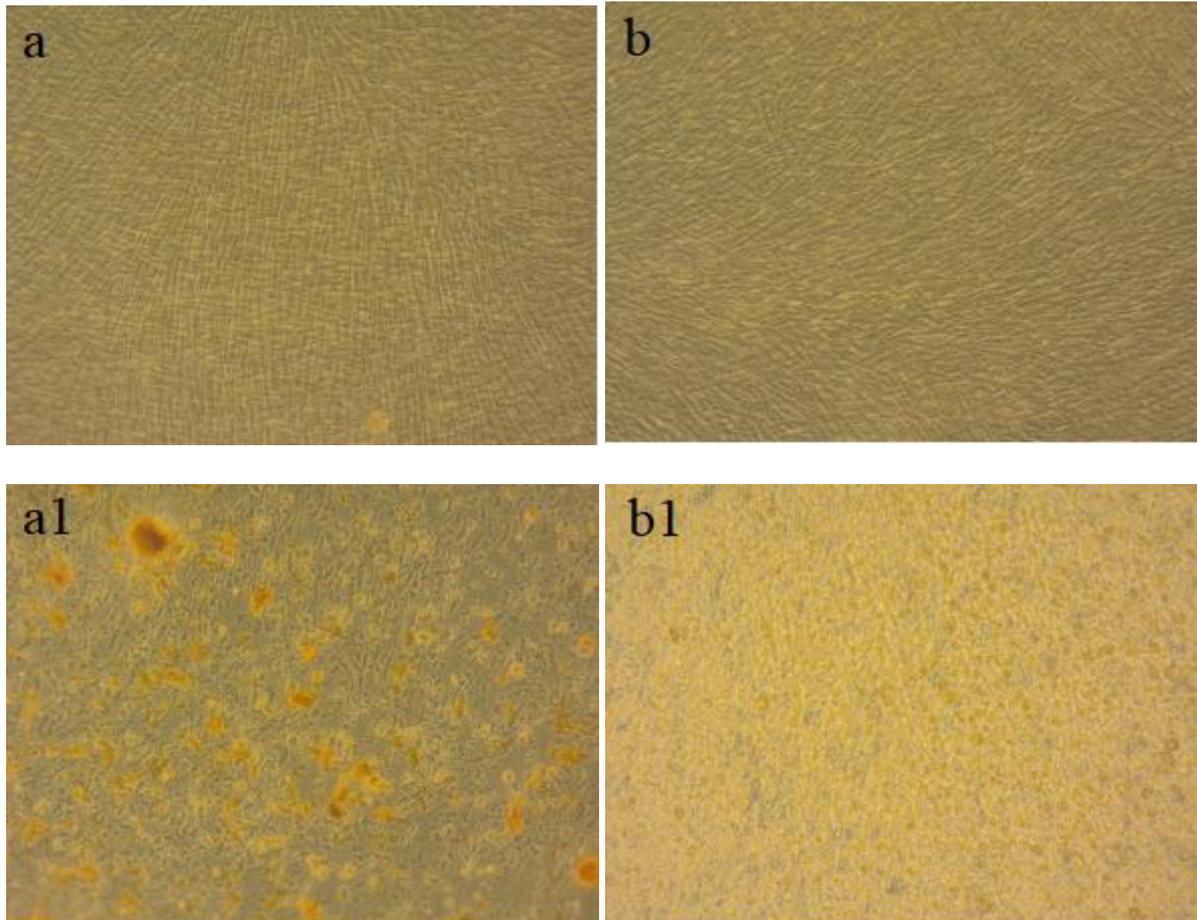


Fig. 43 - Prancha dos resultados aos 14 dias de experimento, os grupos experimentais Ti e ZrN apresentaram resultados positivos. Células tronco mesenquimais de polpa dentária com a presença de extratos dos grupos experimentais Ti e ZrN: (a) poço controle do grupo experimental Ti, **sem** meio de diferenciação; (a1) poço com células do grupo experimental Ti diferenciadas após 14 dias; (b) poço controle do grupo experimental ZrN, **sem** meio de diferenciação; (b1) poço com células do grupo experimental ZrN diferenciadas após 14 dias. Fotos em objetiva 10x do microscópio óptico invertido (Primovert Trinocular, Zeiss).

No presente estudo, o grupo Zr não demonstrou os mesmos indicativos de diferenciação celular após os 14 dias de ensaio (Fig. 44).

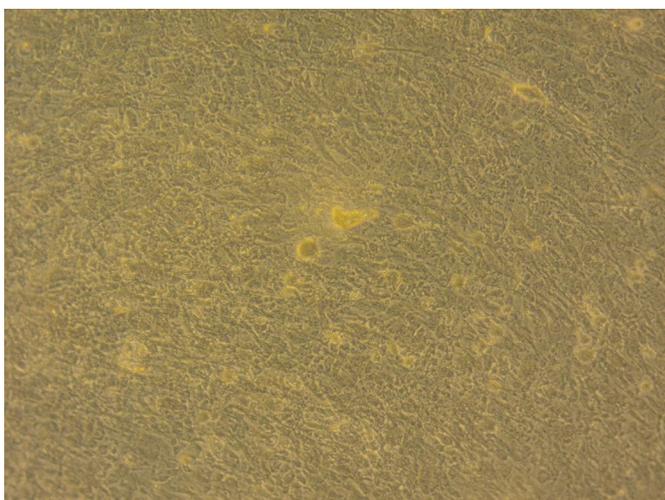


Fig. 44 - Indicativos de diferenciação celular após os 14 dias de ensaio. Células tronco mesenquimais de polpa dentária com a presença de extrato do grupo experimental Zr, após 14 dias de ensaio. Foto em objetiva 10x do microscópio óptico invertido (Primovert Trinocular, Zeiss)

5. 4 Resultados dos ensaios de Osteoindução por contato com células mesenquimais estromais extraídas de lipoaspirado humano - em Meio de Cultivo DMEM (Low glucose).

Os resultados foram colhidos, inicialmente, pela adesão das células aos frascos de cultura, pela aparência fusiforme e pela interação das células com as superfícies testadas, em exame de Microscopia Eletrônica de Varredura.



Fig. 45 - Células em frasco de cultivo, já em confluência, mostrando adesão e aspecto fusiforme, o que é uma das características de células mesenquimais indiferenciadas. Foto obtida em microscópio invertido Zeiss.

Nas trocas de meio de cultivo, o extrato dos poços foi colhido em microtubos *Eppendorf*, identificado, e congelado a -75°C , para posterior análise de indução ou proteômica, Elisa ou de Fosfatase Alcalina, ou outros.

Ao se aproximar a data de 21 dias, uma amostra de cada condição foi removida, fixada, metalizada e preparada para Microscopia Eletrônica de Varredura, para se examinar o tipo de interação celular com cada superfície.



Fig. 46 - Mostra os meios de cultura aspirados (extratos) de cada poço agrupados e identificados segundo cada condição;

e preparados para congelação a $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$. , para posterior exame de detecção e análises necessárias.

Ao exame em Microscopia Eletrônica de Varredura, os resultados encontrados foram os seguintes:

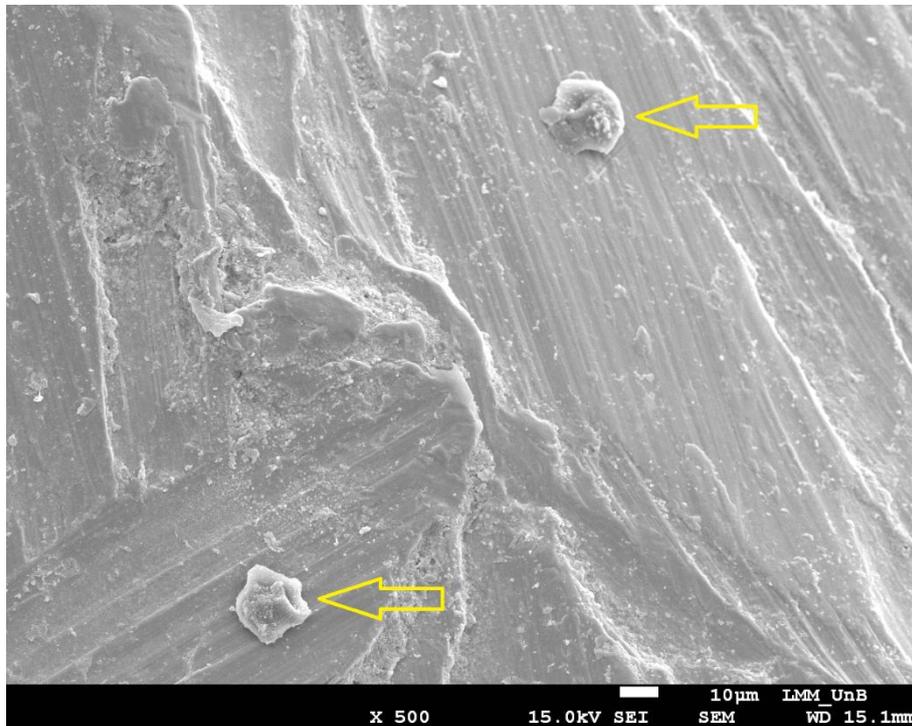


Fig. 47 - Células aderidas sobre a superfície de Titânio. MEV aumento de 500 x .

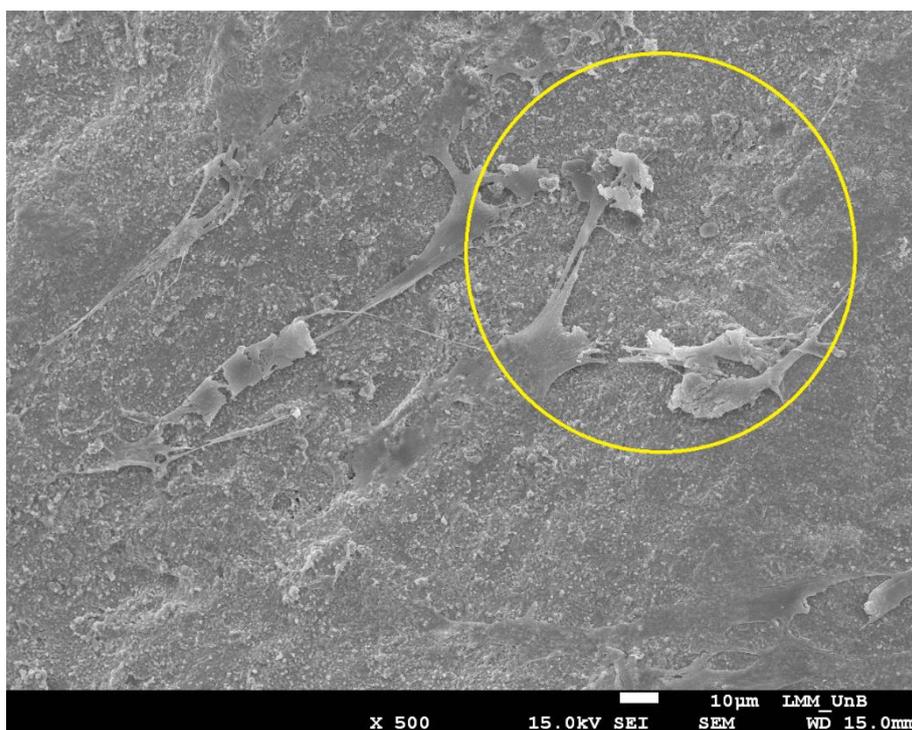


Fig. 48 - Células mostrando forte interação com a superfície de Zircônia.

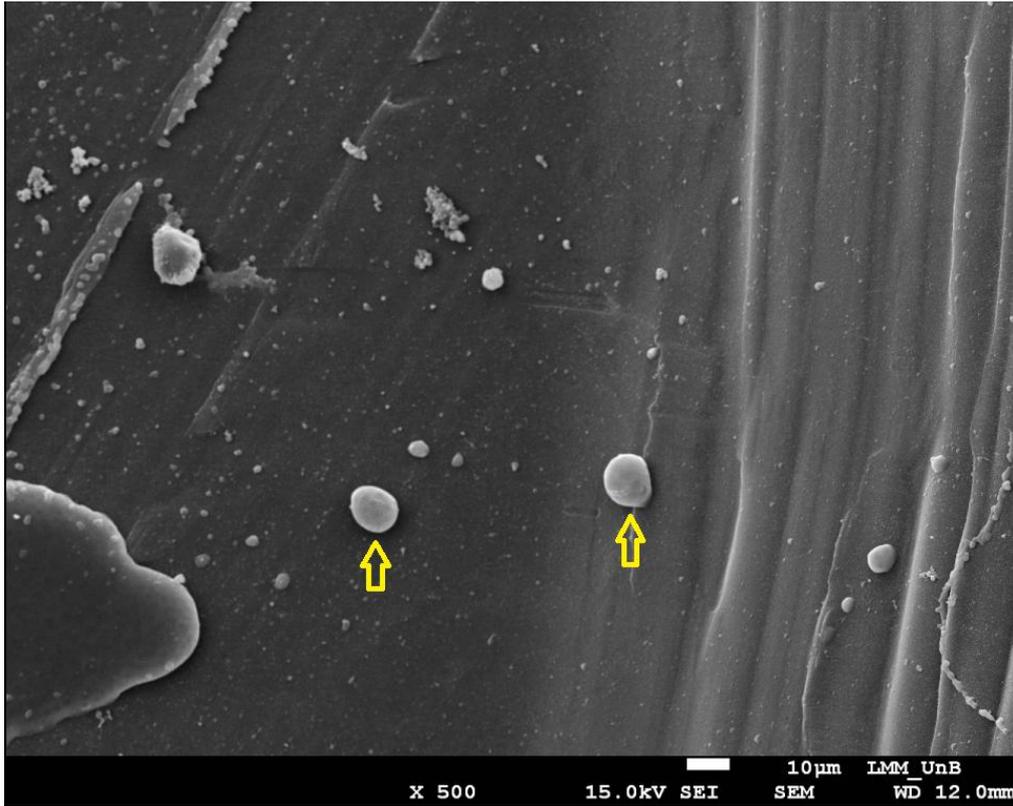


Fig. 49 – Controle negativo. Notar as células esféricas, sem nenhuma interação com os discos de tampa de Eppendorf - Controle negativo. MEV aumento de 500 x .

6. DISCUSSÃO

No Ensaio com Células de Polpa Dentária Humana em Meio de Expansão Mesenquimal, quanto à Viabilidade Celular, os resultados indicam que os extratos do grupo Ti podem ter um efeito positivo na viabilidade celular após 48h, quando em comparação com o grupo Zr e ZrN. Entretanto, é importante ressaltar que a viabilidade celular é apenas um dos parâmetros que podem ser afetados pelo tipo de material escolhido como implante dentário e ortopédico. Estudos adicionais são necessários para avaliar outros aspectos da função celular, como a proliferação, a apoptose e a migração, para determinar o efeito completo dos grupos experimentais.

A osteointegração bem-sucedida dos implantes depende não apenas das células que estão em contato direto ao implante e, conseqüentemente, sofrem a diferenciação osteogênica devido à topografia e química superficial, mas também com a capacidade do biomaterial de influenciar as células à distância do implante. Mesmo porque as células mesenquimais indiferenciadas fazem contato direto é com uma camada proteica, plasma, plaquetas e neutrófilos que estão aderidos sobre o implante (OLIVARES-NAVARRETE, 2010; RESENDE, 2017). Esses autores esclarecem detalhadamente que, após a colocação do implante, sua superfície é colonizada por proteínas e células que compõem o coágulo. As células osteoprogenitoras serão influenciadas por todos esses fatores e eventos. E que tudo isso é regulado pela composição química da superfície do implante, sua energia, estrutura micro-nano-topográfica, o que influencia até a forma das células que vão se aderir ao implante. Essa células influenciam as células mais distantes por regulação parácrina.

Quanto à energia e composição química, a interação com os tecidos do hospedeiro são tanto maiores quanto mais recente a colocação do implante. Explicando melhor: Se há algum fator químico que influa negativamente o osso e tecidos circundantes, esse fator químico decairá com o tempo, pelo esgotamento dessa energia ou quantidade livre do elemento químico em questão. Isso pode ser uma das explicações para o gráfico da interação a distância das células com o titânio haver melhorado com o passar do tempo, sendo até melhor que o controle (fig. 41). Também, pode ser que, após vencer todas as barreiras, as células tenham encontrado uma situação ideal, após as primeiras 24 horas de adequação, e a osteoindução se desencadeie de maneira mais fácil.

No ensaio *in vitro* de osteoindução à distância realizado com Células de Polpa Dentária Humana em Meio osteogênico (HM), foram observadas respostas variadas em relação à capacidade osteoindutiva dos materiais de implante. As células tronco mesenquimais de polpa dentária sem a presença de extratos, utilizadas como grupo controle cultivadas, exibiram sinais de diferenciação osteogênica já com 7 dias de ensaio, conforme indicado pela presença de coloração após o uso do Vermelho de Alizarina (Fig. 42). Este resultado inicial do grupo controle com células é um indicativo robusto da atividade osteogênica intrínseca das células provenientes dessa fonte e estabelece um parâmetro positivo para a comparação com os grupos experimentais deste estudo (Controle Positivo).

Quanto à Osteoindução, em um intervalo de tempo estendido para 14 dias, os extratos dos grupos experimentais Titânio e Zircônia apresentaram resultados positivos, demonstrando coloração semelhante ao controle (Fig. 43). Isso sugere que ambos os extratos destes materiais possuem propriedades que favorecem a diferenciação celular em direção a um fenótipo osteogênico, corroborando com a literatura que aponta o Titânio e Zircônia como potenciais promotores da osseointegração (OLIVARES-NAVARRETE, 2010; GITTENS, 2013; OLIVARES-NAVARRETE, 2014).

No estudo de Osteoindução, o grupo Zr não demonstrou os mesmos indicativos de diferenciação celular após os 14 dias de ensaio (Fig. 44). Comumente, os períodos de observação para análise de diferenciação osteogênica usando coloração com vermelho de alizarina são entre 14 e 21 dias após o início da indução osteogênica. Isso permite tempo suficiente para que as células se diferenciem e formem depósitos de mineral calcificado, que são então detetados pela coloração. Entretanto, é importante salientar que as células mantiveram a viabilidade ao longo de todo o período experimental em todos os grupos experimentais. Uma possível explicação para este resultado pode residir na natureza química e nas propriedades da superfície da Zircônia, que traduzidas em seus extratos, podem indicar uma cinética de diferenciação mais lenta às células tronco mesenquimais, necessitando de períodos de observação mais longos. Esses resultados ressaltam o papel complexo e dinâmico dos materiais na regulação do comportamento celular e a viabilidade celular sustentada em todos os grupos confirma a biocompatibilidade dos materiais, um pré-requisito fundamental para sua aplicação em implantes dentários e ortopédicos.

No Ensaio por contato, as células mesenquimais indiferenciadas mostraram interação com as amostras de superfícies, mas não mostraram reação aos controles negativos (fig. 49). A maior interação deu-se com as superfícies de zircônia (fig. 48), em imagem compatível com

o resultado de outros autores. Mas, mesmo assim, não foi evidenciado início de formação mineralizada. Pelo menos, foi o que se pode observar nas análises iniciais.

A hipótese de formação óssea pelo simples contato não foi evidenciado. Possivelmente pelo fato de as amostras não terem ficado o espaço de dias suficientes para que houvesse a indução osteogênica, ou por falta do meio específico de indução osteogênica.

Justo por isso o método experimental foi repetido, usando-se Células Mesenquimais Indiferenciadas de Polpa Dentária Humana em Meio de Cultivo Osteogênico.

Se os osteoblastos representam o ponto central para se lograr uma boa osteointegração, e as pesquisas investigando a proliferação dessas células indicam biocompatibilidade e bioatividade, como explica Chopra e cols. (2024) ao avaliar a interface tecido-implante, podemos inferir que o tratamento superficial nas amostras ZrN apresentaram resultados muito promissores.

7. CONCLUSÕES

Não obstante as limitações aqui observadas dos experimentos, parece-nos lícito concluir que:

- ❖ Os discos de Titânio e Zircônia não afetaram de maneira expressiva o crescimento de células mesenquimais indiferenciadas de origem de polpa dental humana, quando examinados os extratos de 24h e 48h em cultivo com meio HM ;
- ❖ As superfícies dos implantes testados (Ti, Zr e ZrN) não são tóxicas às células mesenquimais indiferenciadas;
- ❖ Há uma boa compatibilidade entre os materiais de implante testados e as células mesenquimais indiferenciadas, sendo os discos de zircônia ligeiramente superiores aos de titânio, quanto à compatibilidade ($p < 0,05$) ;
- ❖ O tratamento superficial dos implantes representados pelo grupo ZrN pode ter um efeito positivo na viabilidade celular após 24h, em comparação com o grupo experimental Ti ;
- ❖ Quanto à viabilidade celular, grupo Ti exibiu uma viabilidade notavelmente elevada ($p < 0,01$) ;
- ❖ A resposta celular aos diferentes materiais pode variar não apenas em função da composição dos implantes, mas também em relação à duração da exposição no ensaio, ressaltando a complexidade inerente aos processos de biocompatibilidade *in vitro* ;
- ❖ Ambos os extratos destes materiais testados (Titânio e Zircônia) possuem propriedades que favorecem a diferenciação celular em direção a um fenótipo osteogênico.
- ❖ O simples contato de células mesenquimais indiferenciadas com superfícies de Titânio e Zircônia – embora observada uma forte interrelação – não foi o suficiente para desencadear a diferenciação osteoblástica, com o meio de cultivo DMEM-Low.

7.1 Perspectivas futuras

Os resultados obtidos sugerem a necessidade de uma análise mais profunda da interação célula-extrato do material para entender as dinâmicas celulares e a viabilidade a longo prazo, pontos cruciais para o sucesso dos implantes dentários e ortopédicos.

Estudos adicionais são necessários para avaliar outros aspectos da função celular, como a proliferação, a apoptose e a migração, para determinar o efeito completo dos grupos experimentais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFANASYEV, B.V.; ELSTNER, E.E.; ZANDER, A.R. A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. 2009. disponível em CC em <https://cyberleninka.ru/article/n/a-j-friedenstein-founder-of-the-mesenchymal-stem-cell-concept>, acessado em 2024.
- 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. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 45, n. 7, p. 842-850, 2016. DOI: 10.1016/j.ijom.2016.01.004.
- ANTUNES, K. B.; NICOLA, M. H. A. Diferenciação in vitro de células-tronco adiposas mesenquimais em osteoblastos. *INPerio*, v. 5, n. 2, p. 315-324, 2020.
- BANCROFT, J.; Stevens, Alan, eds. (1982). *The Theory and Practice of Histological Techniques* (2nd ed.). Longman Group Limited.
- BENNET, M.; AKIRA, A.; FAIVRE, D.; MALKINSON, G.; YANIV, K.; ABDELILAH-SEYFRIED, S.; FRATZL, P.; MASIC, A. Simultaneous Raman Microspectroscopy and Fluorescence Imaging of Bone Mineralization in Living Zebrafish Larvae. *Biophysical Journal*, v. 106, p. L17-L19, 2014.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*, v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008. DOI: 10.1016/j.stem.2008.03.002.
- BONFANTE, E.A.; COELHO, P.G. Materiais implantáveis in GRANJEIRO, J. M.; SOARES, G. D. A. *Biomateriais em Odontologia – Princípios, Métodos Investigativos e Aplicações*. São Paulo: VM Cultural, 2011. 207 p. ISBN 9788564761001.
- BORGES, H.; CORREIA, A. R. M.; CASTILHO, R. M.; FERNANDES, G. V. O. Zirconia Implants and marginal bone loss: A systematic review. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, v. 35, n. 4, p. 707-720, 2020.
- BUENO, D. F. Fissuras lábio-palatais. Webinar Inovações no tratamento clínico à bioengenharia de tecidos nas malformações congênitas. *Proadi-SUS Hosp. Sírio-libanês*, nov. 2020.
- CHOPRA, D.; GUO, T.; JAYASREE, A.; GULATI, K.; IVANOVSKI, S. Bioinspired, Bioactive, and Bactericidal: Anodized Nanotextured Dental Implants. *Advanced Functional Materials*, v. 23, p. 140031, 2024. DOI: 10.1002/adfm.202314031.
- CHOPRA, D.; JAYASREE, A.; GUO, T.; GULATI, K.; IVANOVSKI, S. Advancing dental implants: Bioactive and therapeutic modifications of zirconia. *Bioactive Materials*, v. 13, p. 161-178, 2022.
- DA ROSA, E. L. S. Análise morfológica e proteômica da captação de nanopartículas de dióxido de titânio por neutrófilos humanos in vitro. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, 2012.
- DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; VANLAUWE, J.; EYCKMANS, J.; KHAN, I. M.; ARCHER, C. W.; JONES, E. A.; MCGONAGLE, D.; MITSIADIS, T. A.; PITZALIS, C.; LUYTEN, F. P. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells

- demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 54, n. 4, p. 1209-1221, 2006.
- DEGIDI, M.; PIATTELLI, A.; GEHRKE, P.; FELICE, P.; CARINCI, F. *J Oral Implantol*, v. 32, n. 6, p. 277-285, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1563/0.795.1>
- 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. *Dental Materials*, v. 31, n. 2, p. e1-e13, 2015. DOI: 10.1016/j.dental.2014.10.002.
- EMSLEY, J. *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*. Oxford: Oxford University Press, 2003.
- ENGLISH, D. The Remarkable Neutrophil! Developing a Blueprint for Integrated Cellular Signaling. In: GABRILOVICH, D. I. (Ed.). *The neutrophils: new outlook for old cells*. 2. ed. London: Imperial College Press, 2005.
- FEDOROV, A. G.; RUPP, F.; BOYAN, B. D.; TANNENBAUM, R.; SCHWARTZ, Z. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 4, p. 6268-6277, abr. 2013. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.12.002
- FRIEDENSTEIN, A. Y. Induction of bone tissue by transitional epithelium. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 59, p. 21-37, 1968. DOI: 10.1097/00003086-196807000-00003.
- 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.
- GITTENS, R. A.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; CHENG, A.; ANDERSON, D. M.; McLACHLAN, T.; STEPHAN, I.; GEIS-GERSTORFER, J.; SANDHAGE, K. H.; FEDOROV, A. G.; RUPP, F.; BOYAN, B. D.; TANNENBAUM, R.; SCHWARTZ, Z. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 4, p. 6268-6277, abr. 2013. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.12.002
- GRANJEIRO, J. M.; SOARES, G. D. A. *Biomateriais em Odontologia – Princípios, Métodos Investigativos e Aplicações*. São Paulo: VM Cultural, 2011. 207 p. ISBN 9788564761001.
- GULATI, K. *Surface Modification of Titanium Dental Implants*. Springer Nature, Switzerland, 2023.
- GULATI, K.; CHOPRA, D.; KOCAK-OZTURK, N. A.; VERRON, E. Fit and forget: The future of dental implant therapy via nanotechnology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 199, p. 114900, 2023.
- HALL, J. E. *GUYTON & HALL Tratado de Fisiologia Médica*. Elsevier, 2017.
- ISO 10993-5:2009. *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. International Organization for Standardization, 2009.

- KELLER, J. C.; STANFORD, C. M.; WIGHTMAN, J. P.; DRAUGHN, R. A.; ZAHARIAS, R. Characterizations of titanium implant surfaces. III. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 28, p. 939-946, 1994.
- KIRMANIDOU, Y.; SIDIRA, M.; DROSOU, M. E.; BENNANI, V.; BAKOPOULOU, A.; TSOUKNIDAS, A.; MICHALIDIS, 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 Research International*, v. 2016, p. 2908570, 2016. DOI: 10.1155/2016/2908570
- LEGAN, Lea; Retko, Klara; Ropret, Polonca (2016). "Vibrational spectroscopic study on degradation of alizarin carmine". *Microchemical Journal*. 127: 36–45. doi:10.1016/j.microc.2016.02.002. ISSN 0026-265X.
- LILLIE, R. D. (1977). *H. J. Conn's Biological stains* (9th ed.). Baltimore: Williams & Wilkins. Pp. 692p.
- LEE, B-C; YEO, I-S; KIM, D-J; LEE, J-B; KIM, S-H; HAN, J-S. Bone formation around zirconia implants combined with rhBMP-2 gel in the canine mandible. *Clinical Oral Implants Research*, v. 24, p. 1332-1338, 2013. DOI: 10.1111/clr.12004.
- LEYENDECKER JR., PINHEIRO, C. C. G.; FERNANDES, T. L.; BUENO, D. F. The use of human dental pulp stem cells for in vivo bone tissue engineering: A systematic review. *Journal of Tissue Engineering*, v. 9, p. 1-18, 2018.
- LONZA, 2024 - DPSC Human Dental Pulp Cells. Disponível na internet em: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/US/en/Primary-and-Stem-Cells/p/000000000000203093/DPSC---Human-Dental-Pulp-Stem-Cells
- MATSUDA, S.S. Efeito diferencial do flúor durante a mineralização de osteoblastos de duas espécies de camundongos. Tese (Doutorado) - Universidade de Bauru, 2010.
- MATSUDA, T. Tissue-engineered organs for regenerative medicine. *Journal of Artificial Organs*, v. 13, n. 2, p. 77-83, 2010.
- NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. *Nature Immunology*, v. 15, p. 602-611, 2014.
- NAUSEEF, W. M. Neutrophils, from cradle to grave and beyond. *Immunological Reviews*, v. 273, p. 5-10, 2016. DOI: 10.1111/imr.12463.
- OLIVARES-NAVARRETE, R.; HYZY, S. L.; HUTTON, D. L.; ERDMAN, C. P.; WIELAND, M.; BOYAN, B. D.; SCHWARTZ, Z. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials*, v. 31, n. 10, p. 2728-2735, abr. 2010. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.029
- OLIVARES-NAVARRETE, R.; HYZY, S. L.; HUTTON, D. L.; ERDMAN, C. P.; WIELAND, M.; BOYAN, B. D.; SCHWARTZ, Z. Indirect effects of microstructured titanium substrates on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 102, n. 5, p. 1321-1332, mai. 2014. DOI: 10.1002/jbm.a.34843
- OSMAN, R. B.; SWAIN, M. V. A critical review of dental implant materials with emphasis on titanium versus zirconia. *Materials*, v. 8, p. 932-958, 2015. DOI: 10.3390/ma8030932.

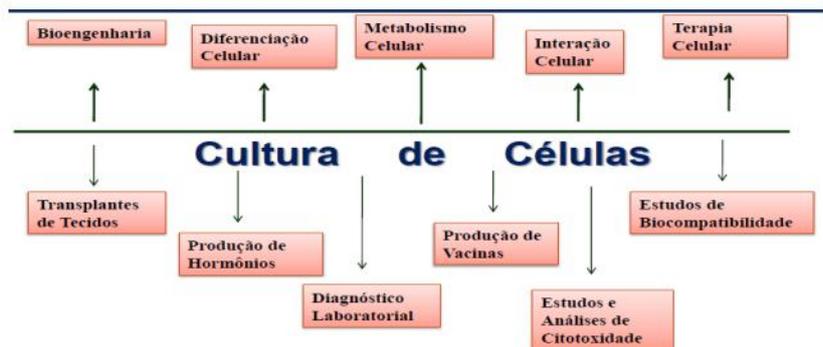
- OSMAN, R. B.; SWAIN, M. V.; ATIEH, M.; MA, S.; DUNCAN, W. Ceramic implants (Y-TZP): Are they a viable alternative to titanium implants for the support of overdentures? A randomized clinical trial. *Clinical Oral Implants Research*, v. 25, p. 1366-1377, 2014.
- OUGHLLIS, S.; LESSIM, S.; CHANGOTADE, S.; POIRIER, F.; BOLLOTTE, F.; PELTZER, J.; FELGUEIRAS, H.; MIGONNEY, V.; LATAILLADE, J. J.; LUTOMSKI, D. The osteogenic differentiation improvement of human mesenchymal stem cells on titanium grafted with polyNaSS bioactive polymer. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 101, n. 2, p. 582-589, 2012.
- ÖZKURT, Z.; KAZAZOĞLU, E. Zirconia dental implants: a literature review. *Journal of Oral Implantology*, v. 37, n. 3, p. 367-376, 2011. DOI: 10.1563/AAID-JOI-D-09-00079.
- PEDRAZZI, A. Fissura lábio-palatina. In: Webinar Inovações no tratamento clínico à bioengenharia de tecidos nas malformações congênitas, Proadi-SUS Hosp. Sírio-libanês, nov. 2020.
- PESSOA, R. S.; SOUSA, R. M.; PEREIRA, L. M.; NEVES, F. D.; BEZERRA, F. J.; JAEQUES, S. V.; SLOTON, J. V.; QUIRYNEN, M.; TEUGHELS, W.; SPIN-NETO, R. Bone Remodeling Around Implants with External Hexagon and Morse-Taper Connections: A Randomized, Controlled, Split-Mouth, Clinical Trial. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, v. 19, n. 1, p. 97-110, 2017. DOI: 10.1111/cid.12437.
- PUCHTLER, H.; MELOAN, S.N.; TENRY, M.S. (1969). "On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium". *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 17 (2): 110–124. doi:10.1177/17.2.110. ISSN 0022-1554. PMID 4179464.
- 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.
- RESENDE, R. V. Ativação de neutrófilos por superfícies de titânio e zircônia. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2017.
- RICKWOOD, D.; HAYES, T. D. *Centrifugation: a practical approach*. Oxford: Oxford Univ Press, 1990.
- RMI Titanium Company. *Titanium alloy guide*. Niles: RMI, 2000.
- ROCHE Diagnostics GmbH. *Cell Proliferation Reagent WST-1. Product Information*. Roche Applied Science, 2024.
- SAITO, M.; KARAKIDA, T.; YAMAMOTO, R.; NAGANO, T.; YAMAKOSHI, Y.; HAYAKAWA, T.; OIDA, S.; GOMI, K. Differentiation potential of osteoblast from cultured C2C12 cells on zirconia disk. *Dental Materials Journal*, v. 33, n. 2, p. 275-283, 2014. PMID: 24682023.
- SIGMA-ALDRICH / MERCK Products 2017. Bula disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11585029001?lang=pt®ion=BR>, acessado em 11 out. 2017.
- SILVA, V. C. Caracterização morfológica e funcional da adesão de neutrófilos em diferentes superfícies de titânio. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 2011.

- STEIN, G. S.; LIAN, J. B. Molecular Mechanisms Mediating Proliferation/Differentiation Interrelationships During Progressive Development of the Osteoblast Phenotype. *Endocrine Reviews*, v. 14, n. 4, p. 424-442, 1993.
- STIEHLER, M.; LIND, M.; MYGIND, T.; BAATRUP, A.; DOLATSHAHI-PIROUZ, A.; LI, H.; FOSS, M.; BESENBACHER, F.; KASSEM, M.; BÜNGER, C. Morphology, proliferation, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on titanium, tantalum, and chromium surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 86, n. 2, p. 448-458, 2008. DOI: 10.1002/jbm.a.31602.
- SCHWARTZ, Z. et al. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials*, v. 31, n. 10, p. 2728-2735, abr. 2010. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.029
- TABASKY, I.; STERN, J.N.H. Basics of stem cell biology as applied to the brain. 2016. doi: 10.10007/978-3-319-41603-8_2 in PFAFF, D.; CHRISTEN, Y. *Stem Cells in Neuroendocrinology* Springer. 2016 online under CC
- TAKAHASHI, Y.; YOSHIDA, Y.; MARUYAMA, K.; NAGAI, M.; SHIMIZU, T.; YAMAMOTO, H.; YOSHIKAWA, T.; SASAKI, K.; KURASAKI, M. Evaluation of the cytotoxicity of dental materials by using WST-1 assay. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 90, n. 2, p. 683-691, nov. 2009. DOI: 10.1002/jbm.b.31343
- THOMAS SCIENTIFIC. Roche cell proliferation reagent WST-1 , 2024. disponível em https://www.thomasci.com/Chemicals/Reagent-C/_/ROCHE-Cell-Proliferation-Reagent-WST-1

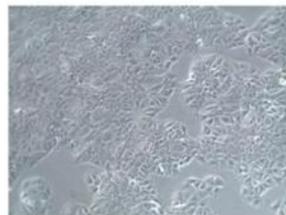
9. Apêndices e Anexos

Protocolo de CULTURA DE CÉLULAS HUMANAS

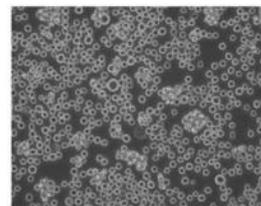
- Estude a linhagem com que irá trabalhar.
- Consultar os *data sheets* (ATCC e/ou BCRJ) para saber qual as condições ideais de cultivo para cada linhagem celular (tipo de meio, frequência de passagem, etc).
- Conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células isoladas fora do organismo onde existem, mantendo as características próprias.



- As células podem crescer aderidas ao frasco de cultura ou em suspensão.



Célula MCF7 – Tumor de mama



Célula K562 – Leucemia mieloide

- **Classificação de células segundo a origem:**

- Cultura Primária: Células recém-tiradas do tecido in vivo e cultivadas in vitro. No de mitoses limitado.
- Linhagem celular estabelecida: imortalizadas → N o de mitoses ilimitado. Inibição por contato.
- Linhagem celular transformada: características tumorais → N o de mitoses ilimitado. Não apresenta Inibição de crescimento por contato.

- **Limitações da cultura de células:**

- Mão de obra especializada.
- Requer ambiente controlado.
- Uso de produtos de origem animal

- Instabilidade dos lotes.
- Instabilidade de linhagens.
- **Custo elevado.**

OBSERVAÇÕES GERAIS

O TRABALHO NA SALA DE CULTURA CELULAR REQUER:

- Treinamento
- Concentração
- Planejamento
- Assepsia constante
- Medidas de segurança
- Uso de EPI (Equipamento de proteção individual)



- Metodologia
 - a. Planejar as etapas necessárias à realização do protocolo para evitar as saídas constantes do fluxo laminar e da sala de cultivo.
 - b. Manter a porta sempre fechada. Evitar a permanência de pessoas que não estejam diretamente envolvidas no trabalho naquele momento.



c. Antes de iniciar, lave bem as mãos com água e sabão.

d. Colocar os EPIs obrigatórios:

- Jaleco: Cada usuário deverá ter o jaleco exclusivo para a sala de cultivo. Evitar transitar fora da sala de cultivo vestindo este jaleco. O jaleco deve ser lavado no máximo quinzenalmente.
- Máscara: reutilizar sempre que possível
- Touca: reutilizar sempre que possível
- Óculos (individual e indispensável ao utilizar o fluxo laminar)
- Luvas (Obs: não manipular celulares, tablets e afins com luvas)



e. Reagentes para a cultura (meio, tripsina, etc):

- Limpar recipientes com álcool 70% antes de colocar no banho-maria (37°C).

Obs: Observar o nível da água e a presença de “sujeiras” no banho. Caso necessário

adicione água destilada. Em caso de sujeiras, contactar os técnicos.

- Pré-aquecer reagentes por ~15 minutos.

f. Fluxo laminar:

- Limpar com álcool 70% e papel antes de iniciar o trabalho;
- Ligar UV e motor por 15 minutos (deixar a superfície completamente desocupada para ação germicida da luz UV);
- Desligar o UV e manter o motor ligado;
- Colocar os materiais e descartes a serem usados

previamente limpos com álcool 70% e tirar o excesso com papel toalha. (manter no fluxo apenas os materiais que serão prontamente utilizados).

- Limitar a entrada de papel ou material que soltam partículas dentro do fluxo;
- Nunca manipular no fluxo laminar dois ou mais tipos de linhagens celulares;

Obs: abrir as embalagens de material descartável (tubos cônicos, frasco e placas de cultura) dentro do fluxo laminar e sempre fechá-los com fita adesiva ou elástico, antes de retirá-los de dentro do fluxo;

g. Incubadora:

- Limpar as mãos com álcool 70% antes de abrir as incubadoras, onde se encontram as células;
- Ao devolver garrafas de células à incubadora, limpá-las (Com gase ou papel toalha umedecido com álcool 70%).
- Não falar, enquanto estiver com a incubadora aberta;



➤ Observar o nível da água da **bandeja de dentro da incubadora** e a presença de “sujeiras” na mesma. Caso seja necessário adicionar mais água, utilizar as previamente autoclavadas em garrafas com rótulo “Água da estufa” localizadas na antesala. Em caso de sujeiras, contactar os técnicos

- **Atenção** para tampa do frasco!

h. Microscópio:

- Ligar a lâmpada no início do dia e manter no nível mínimo de luz enquanto não estiver sendo usado.
- Desligar no fim do expediente.
- Não retirar o contador de células do lugar.

i. Finalizando o trabalho :

- Feche bem todos os materiais esterilizados antes de retirar do fluxo.
- Desligue o motor do fluxo e limpe as superfícies e pipetas com álcool 70 %.
- Guarde os materiais em local apropriado.
- Reponha materiais que acabarem. Anote o que foi retirado do estoque.
- Lavar e descartar adequadamente tubos, ponteiras, frascos e garrafas.



Obs: não manipular celulares, tablets e afins com luvas.

UnB – Apostila BOAS PRÁTICAS EM CULTIVO DE CÉLULAS Laboratório de Nanobiotecnologia – GEM/UnB . 2020. p. 2 citação e figura tb.

Pré-aquecer reagentes por ~15 minutos.

PASSAGEM DE LINHAGENS CELULARES

(Obs: Sempre com pipeta sorológica)

- Estude a linhagem com que irá trabalhar.

➤ Consultar os datasheets (ATCC e/ou BCRJ) para saber qual as condições ideais de cultivo para cada linhagem celular (tipo de meio, frequência de passagem, etc).

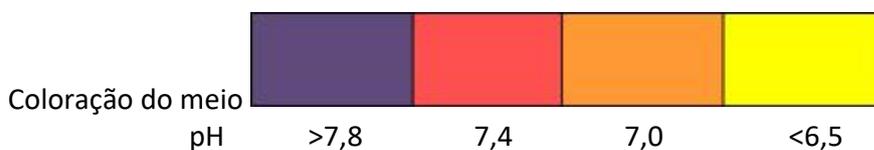
➤ Examine sua cultura **diariamente**.

1) Retire a garrafa da estufa. Manter tampa fechada!

- Examinar toda a extensão do frasco.

- Turbidez, morfologia e confluência (respeitar a confluência máxima adequada para cada linhagem, consultar ATCC).

- Células soltas → células mortas. Não usar se houver muitas células soltas (>30%).



Descartar a cultura se a coloração do meio estiver violeta, laranja claro ou amarelo (*Obs:* existem meios especiais em que essa coloração pode variar. Consultar o responsável sempre antes de descartar uma garrafa devido à coloração do meio.

FIM p. 6

Descartar a cultura se houver presença de contaminantes.

Obs: Ao manipular células aderentes, mantenha, sempre que possível, a garrafa deitada para

que a monocamada fique sempre hidratada.



2) Proceder com a tripsinização:

Tripsinização

a) Incubar tripsina, solução salina e meio de cultivo no banho maria (37°C) por 15 minutos.

b) Descartar o meio vertendo a garrafa no descarte apropriado (estreito e com tampa):

c) Lavar a garrafa de 25 cm² com cerca de 2 mL a 3 mL de PBS (2 x).

Obs: Toda manipulação das células na garrafa deverá ser com o uso de pipeta sorológica, jamais utilizar as micropipetas automáticas nas garrafas de células.

- Verter a garrafa para descartar.

d) Adicionar tripsina (pré-aquecida à 37°C) na face interna do lado oposto à monocamada de células:

-1 a 2 mLs para frasco de 25 cm²

- 2 a 3 mLs para frasco de 75 cm²

e) Fechar a garrafa.

f) Acompanhar a tripsinização no microscópio invertido por 5 a 10 minutos. (se necessário, colocar na estufa por mais alguns poucos minutos e bater suavemente na lateral da garrafa).

Obs: Em caso de reaproveitamento da garrafa, TODAS as células devem estar soltas. Se ainda houver células aderidas, retorne o frasco para estufa por mais 3 minutos. O mesmo frasco pode ser reutilizado até 2X.

g) Caso seja necessário centrifugar as células:

- Adicionar meio de cultivo (mesmo volume da tripsina adicionada).
- Transferir o conteúdo da garrafa para um tubo Falcon de 15 mL.
- Centrifugar o tubo contendo a suspensão celular (1000 rpm, 4 ou 5 minutos).

Retire o tubo com cuidado, sem agitar, e leve para o fluxo.

- Descartar o sobrenadante e ressuspender em 5 mL de meio de cultivo e proceder com: replaqueamento, congelamento, contagem de células, etc..

h) Caso **não** seja necessário centrifugar as células:

- Adicionar meio de cultivo na proporção de 1:4 (Tripsina:Meio; Ex: adicionar 1 mL de suspensão de células com tripsina em 4 mL de meio.)
- Proceder com: contagem de células, replaqueamento, congelamento, etc...

Observação: Após a retirada da tripsina ou soro do congelador, voltar o tubo para o refrigerador se ainda restar, assim se tornará de uso pessoal;

Obs: são orientações gerais, tempos podem variar de acordo com linhagem celular. Sempre siga o recomendado na Datacheet da célula (ATCC).

3) Transfira para o frasco a quantidade de células conforme recomendação do Datasheet de cada linhagem.

Exemplo: passagem na proporção 1:10

Considere uma suspensão celular de 5 mL → passar 0,5 mL dessa suspensão para uma nova garrafa igual a usada anteriormente.

Obs: ao passar suspensões celulares de uma garrafa pequena para uma garrafa grande, dobrar tanto o volume de células quanto o volume final de meio.

Exemplo: passagem na proporção 1:10

Considere uma suspensão celular de 5 mL (obtida de uma garrafa de 25 cm) → passar 1 mL dessa suspensão para uma nova garrafa de 75 cm contendo 9 mL de meio.

5) Frequência de passagem

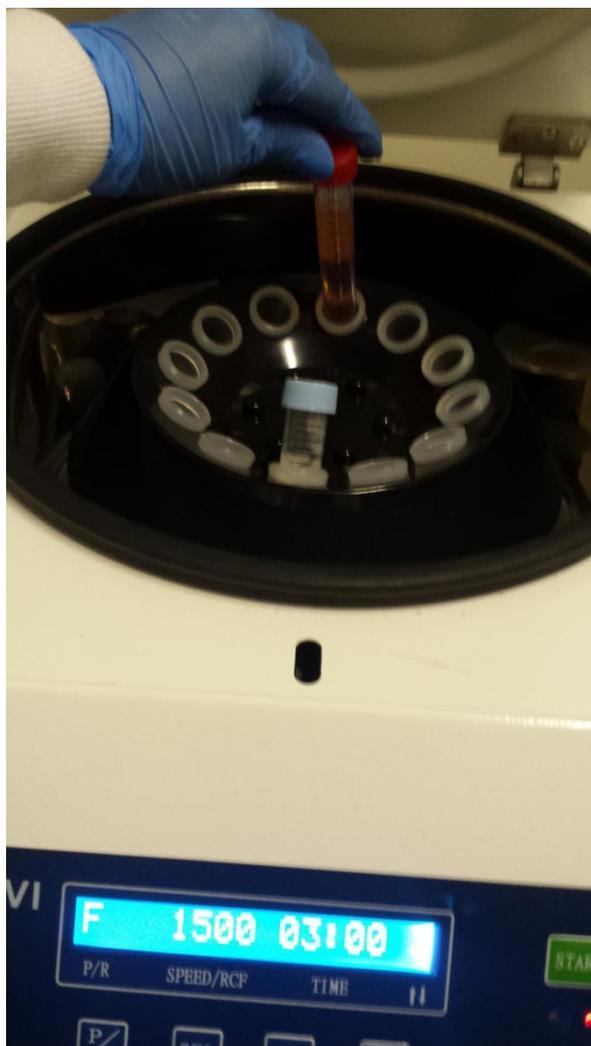
Conforme recomendação do Datasheet de cada linhagem.

- **Em geral, manter o máximo de confluência em torno de 70%.**
- **Não fazer passagens em dias consecutivos.**

CENTRIFUGAÇÃO DE CÉLULAS

- 1) Ligar a centrífuga no botão (power) e levantar a tampa azul.
- 2) Antes da centrifugação é preciso colocar um outro tubo com o mesmo volume para equilibrar. Os tubos com diferentes volumes estão disponíveis no estante entre as duas cabines de segurança.
- 3) Colocar na centrífuga o tubo com as células e baixar a tampa. Gire o botão do tempo no equipamento por 3 minutos. A centrifugação deve ocorrer em temperatura ambiente na velocidade 1000 rpm;

Obs: não mudar o botão da velocidade da centrífuga.



4) Após a centrifugação retirar o tubo com cuidado, sem agitar, limpe abundantemente com álcool 70% e remova o excesso. Leve para cabine de segurança (fluxo). Verificar a formação do pellet de células.

5) Descarte o sobrenadante e ressuspensa as células no meio apropriado.

MEIO DE CULTURA CELULAR

Basicamente, os meios de cultura consistem de uma mistura balanceada de macronutrientes e micronutrientes, carboidratos, fontes orgânicas de nitrogênio, vitaminas e reguladores de crescimento. Esses componentes são, muitas vezes, agrupados e preparados como soluções-estoque, várias vezes concentradas, das quais porções menores são tomadas quando da preparação do meio de cultura.



Antes de tudo: Programe-se para fazer o meio, pois o laboratório possui apenas dois filtros e estes precisam ser autoclavados previamente. E a garrafa para armazenamento do líquido final filtrado também! Monte o filtro e coloque a membrana filtrante (pegue com a pinça, ele está na antessala da sala de cultivo, é a parte branca, e encaixe-a no filtro). Não esqueça de fechar todos os orifícios do filtro, caso não haja tampa, tampar com papel alumínio. **Embale com papel pardo, deixando folgas ao fechar/enroscar tampas por exemplo.**

➤ *Preparo do meio de cultura*

O meio de cultura é específico para a linhagem celular que você irá trabalhar. No laboratório de nanobiotecnologia utilizamos meios em pó (sachês) armazenados na geladeira da ante-sala de cultivo, o qual deve ser preparado conforme o rótulo e dissolvido com água deionizada (Milli-Q). As vidrarias e outros utensílios utilizados devem estar limpos e secos.

Após a preparação, aferição do pH, o mesmo deverá ser imediatamente esterilizado por filtração, utilizando o sistema de filtração devidamente esterilizado, e acondicionado em garrafas também devidamente esterilizadas.

11 Material

- Barquinha (na gaveta próximo as balanças)
- Espátula (na gaveta próximo as balanças ou perdida no escorredor)
- Bicarbonato de sódio (Antessala de cultivo- armário)
- Sachê/ Pó DMEM ou RPMI (gaveta da geladeira da sala de cultivo)

- Proveta 1000 mL (Sala de cultivo ou no lab nano)
- Béquer (armário sala de cultivo ou na estufa secando)
- Balarina

DESCONGELAR DO TAMBOR DE NITROGÊNIO:

CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS (NITROGÊNIO LÍQUIDO, PROCEDIMENTO, CONTROLE DE CONGELAMENTO E REGISTRO)

Descongelamento

O descongelamento de células deve ser realizado com duas finalidades:

- controlar a qualidade do congelamento;
- manter as células em cultivo para experimentos.

O controle de qualidade do congelamento deve ser realizado primeiro para garantir que a linhagem celular apresente características originais descritas no **DATA SHEET ou no site da ATCC** sem ter sofrido modificação, diferenciação e/ou contaminação. O recomendado pelo Banco de Células do Rio de Janeiro é que 1 criotubo de 10 da mesma linhagem celular seja descongelado apenas para controle de qualidade do congelamento.

As etapas 1 a 14 a seguir são idênticas para as duas finalidades.

Antes de remover as células armazenadas no nitrogênio líquido, tenha a certeza de ter todos os equipamentos necessários e reagentes prontos para uso e assim assegurar um degelo eficiente.

Observação: **os dias de descongelamento no laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília são segunda e quinta**. Avisar com antecedência os técnicos para avaliar demanda e abertura do botijão de nitrogênio.

- 1.** Identificar a localização da célula desejada dentro do botijão com auxílio da lista de células congeladas disponível na sala dos técnicos.

- 2.** Preparar a cabine de segurança biológica (limpar e esterilizar) e deixar a garrafa identificada (nome da linhagem, data do descongelamento, número de passagem e nome do usuário) e Falcon de 15 mL com meio de cultura. Usar 9 mL de meio de cultura para 1 mL de solução de células congeladas. Se for descongelar 1 criotubo, usar garrafa de 25 cm². Se for descongelar mais de 1 criotubo, usar garrafa de 75 cm².

- 3.** O usuário acompanha o técnico (previamente avisado) para remover um frasco criogênico de células do tanque de armazenamento de nitrogênio líquido. Se lembrar do uso de material de segurança para evitar queimaduras: luvas térmicas, jaleco, sapatos fechados, óculos de proteção.



Luvas de proteção.



Profa. Leandra Batista com o autor em frente aos tambores de nitrogênio no BCRJ.

4. Role o frasco entre as mãos enluvadas por 3-5 segundos para remover o gelo.
5. Utilizando uma pinça, mergulhe o frasco em banho-maria a 37°C , e ficar agitando em movimento circular para acelerar o processo de descongelamento. Gire o frasco cuidadosamente e observar a evolução do degelo, muitas vezes (mas rapidamente!). Segurando o frasco contra a luz para ver o tamanho dos cristais de gelo. Não mergulhe a tampa do frasco em banho-maria, pois isso pode contaminar as células.

6. Quando as células descongelarem totalmente, ir logo para a cabine de segurança biológica e passar álcool 70% no criotubo.

7. Com uma pipeta de 5 mL, aspirar 3 mL de meio de cultura do falcon e depois aspirar o conteúdo do criotubo.

8. Transferir todo o conteúdo da pipeta para o tubo com restante do meio de cultura e homogeneizar.

9. Retirar uma pequena alíquota (menos de 1 mL) para quantificação celular.

10. Centrifugar o tubo.

11. Descartar o sobrenadante, adicionar 5 mL de meio de cultura (em garrafa de 25 cm²) ou 10 mL de meio de cultura (em garrafa de 75 cm²) e homogeneizar.

12. Transferir todo o conteúdo para uma garrafa de 25 cm².

13. Colocar a garrafa na incubadora a 37° C e 5% CO₂.

14. Registrar na pasta de **Linhagens Celulares** as informações contidas no rótulo do frasco, a data da retirada e o nome do usuário.

Observação: as etapas 7 a 11 podem ser substituídas por: aspirar o conteúdo do criotubo e transferir diretamente na garrafa contendo meio de cultura. → Essa diferença de procedimento ocorre de acordo com as características de cada linhagem celular. Algumas linhagens apresentam sensibilidade maior ao DMSO que precisa ser removido antes de manter as células em cultivo. Olhar o **DATA SHEET** de cada linhagem para determinar qual procedimento é o mais adequado.

• Para o controle de qualidade do congelamento

15. Observar as características das células ao longo dos dias: logo após o descongelamento e após 1 – 2 – 3 – 4 e 7 dias.

→ Observar confluência, morfologia celular, presença de contaminantes, presença de células mortas.

→ Anotar essas observações. Se tudo estiver ok, pode-se iniciar a manutenção das células em cultivo para experimento. Se houver algumas alterações de características celulares, descartar todo o lote congelado.

→ Congelar parte das células na primeira ou segunda passagem para recompor o estoque.

• Para manter células em cultivo para experimentos

15. No dia após o degelo, observar se as células aderiram à garrafa (no caso de linhagem aderente). Se sim, remover a meio de cultura e adicionar 5 mL (T25) ou 10 mL (T75) de meio de cultura fresco.

16. Incubar as garrafas em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂. Proceder a manutenção da cultura conforme o protocolo de cada célula (checar o **DATA SHEET**.)

Congelamento

1. Retirar as células a serem congeladas da garrafa de cultura, conforme protocolo de tripsinização, centrifugar e proceder a contagem das células.

2. Determinar concentração celular utilizando o método de exclusão por azul de tripan e contagem com câmara de Neubauer. Congelar por criotubo células na concentração de 1×10^6 /mL. Em caso de dúvida verificar no site da ATCC (<http://www.atcc.org>) qual a densidade celular para a linhagem em questão.
3. Rotular os frascos criogênicos dentro do gabinete de segurança biológica, incluindo a linha celular, o número de passagem, nome e data de congelamento e quem executou o procedimento.
4. Quando terminar a centrifugação das células. Descartar o sobrenadante do tubo, tomando cuidado para não dispersar o botão celular (*pellet*).
5. Adicionar e ressuspender lentamente o botão celular (*pellet*) com a quantidade adequada de meio de congelamento (concentração de 1×10^6 células/mL). Verificar no site da ATCC ou nos documentos de origem da linhagem celular **DATA SHEET** qual o meio de congelamento específico. A maioria das linhagens utilizam 95% de soro fetal bovino + 5 % de DMSO.

Meio de Congelamento - misturar o volume necessário do Soro Fetal Bovino, com o volume de DMSO (Dimethyl Sulfoxide); esterilizar usando filtro estéril com malha de $0,22 \mu\text{M}$ e seringa. **DEVE SER PREPARADO NO DIA DO USO E PROTEGIDO DA LUZ.**

6. Rapidamente e com cuidado, adicione 1 mL da suspensão de células a cada frasco criogênico.

7. Colocar os frascos criogênicos imediatamente no *Mr Frosty* localizado no -80°C como ilustrado nas fotos



- Contactar os técnicos caso seja necessário repor/completar o isopropanol do *Mr Frosty*.

8. No dia seguinte (ou no próximo dia de abertura do tanque de nitrogênio líquido), transferir rapidamente os frascos criogênicos congelados para um tanque de nitrogênio líquido de armazenamento.

9. Anotar em qual canister e caixa os frascos criogênicos foram colocados na lista de células congeladas disponível na sala dos técnicos.

AO CHEGAR UMA NOVA LINHAGEM CELULAR NO LABORATÓRIO, O RESPONSÁVEL DEVERÁ EXPANDIR AS CÉLULAS E CONGELAR UM MÁXIMO DE CRIOTUBO POSSÍVEL NA PASSAGEM #1 OU #2 PARA CRIAR O PRÓPRIO BANCO.

**CADA USUÁRIO PODERÁ DESCONGELAR 1 CRIOTUBO DESSE BANCO E SERÁ RESPONSÁVEL POR CONGELAR ALÍQUOTAS SUFICIENTES PARA O SEU TRABALHO INTEIRO.
Ou seja, cada usuário deve ter o próprio estoque de células para evitar possíveis contaminações e/ou diferenciações.**

PROTOCOLO DE LIMPEZA DA SALA DE CULTIVO

Ante-sala

Limpar e organizar a ante-sala.

Remover do local qualquer material que não seja necessário permanecer na ante-sala.

Limpar o banho-maria com detergente e água. Em seguida passar álcool em todas as partes e encher com água destilada.

Obs: enxaguar o sabão cuidadosamente e evitar de molhar a parte elétrica do equipamento.

Armários e bancadas

Lavar barrilete de água destilada (água e sabão)

Sala de cultivo

Limpar e organizar armários

Limpar e organizar bancadas

Fluxos

Ensaboar abundantemente com **esponja nova** toda a área de trabalho dentro do fluxo e fora do fluxo;

Deixar o fluxo com sabão por 15 minutos;

Retirar o detergente utilizando um **perflex novo** e água;

Borrifar álcool 70% em toda a área de trabalho;

Ligar a luz UV por 15 minutos.

Incubadoras

Retirar as garrafas de cultivo fechadas e transferir para o fluxo limpo e com o motor ligado;

Retirar todas as partes internas (paredes, prateleiras e bacia) da incubadora e lavá-las com detergente;

Deixar componentes com sabão por 15 minutos;

Remover o detergente com **perflex novo** e água;

Borrifar álcool 70% em todas as superfícies;

Expor as partes internas da incubadora na luz UV por 15 minutos de cada lado;

Adicionar 2 L de água destilada autoclavada na bacia da incubadora.

Microscópio

Limpar suporte de garrafas de células (usar **perflex** umedecido com álcool 70%).

Verificar objetivas, em caso de estarem sujas, comunicar aos técnicos.

Chão

Usar um rodo e panos para passar água com sabão no chão da sala e ante sala. Não usar água sanitária no chão.

Obs: pegar esses materiais com os técnicos.

(CC) Open Access : This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

ANEXOS

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