



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

# **Caracterização morfológica e funcional da adesão de neutrófilos em diferentes superfícies de titânio**

TESE DE DOUTORADO

Aluno: Vitório Campos da Silva, CD-MS

Orientador: Prof. Dr. Wagner Fontes

**Brasília – DF**

**2011**

# Dedicatória

Dedico esta tese à minha esposa Vilma de Pina Campos e às minhas filhas Brenda e Bruna, (extensivo respectivamente, ao Cadu e ao Marcelo), não apenas pelo apoio e sacrifício mas, também por terem sido sempre a razão da minha caminhada e objetivo da minha jornada.

Aos meus irmãos, que não são poucos e, em especial ao Vivi (*in memória*) e à Vera que, como meus pais, sempre investiram em mim.

Dedico também aos meus pais, Vitor Cardoso Campos e Maria Lemos Campos, cuja passagem por essa vida, refletiu-se na bondade de suas ações e altivez de suas atitudes. Por mais que eu estude e aprenda, jamais alcançarei o grau de espiritualidade que os tornaram imortais.

É preciso honrar as ancestralidades mais remotas, e as descendências mais futuras.

Vitório

# Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. Wagner Fontes

Pela sua dedicação, conhecimento e profissionalismo, o que o qualifica como verdadeiro homem de ciência.

Metodologicamente perfeito e cientificamente correto.

Obrigado!

## Agradecimentos

Aos profs. do laboratório de Bioquímica (núcleo de proteômica) da UnB, Lauro Morhy, Mariana Castro, Pedro Zanotta e, em especial, o Carlos André Ornelas Ricart e a Consuelo Medeiros R. de Lima, pelo indisfarçável apoio e incentivo. Acompanhando com interesse o meu trabalho desde o início, me fizeram sentir orientado simultaneamente por vários e competentes pesquisadores.

Ao prof. Marcelo Valle de Souza, chefe do laboratório de Bioquímica, cuja competência é responsável pela harmonia refletida nas atitudes dos professores e alunos. Modelo impecável do trabalho em equipe.

Aos colegas de jornada, alunos de mestrado e doutorado, das mais diversas áreas biológicas, com os quais muito aprendi. Dentistas, médicos, biólogos, bioquímicos, veterinários e biomédicos presentes em nossas reuniões semanais, uma verdadeira “torre de Babel” de especialidades onde todos se entendiam pois, a “argamassa” sempre foi a cooperação e a desinteressada troca de informações e conhecimento. Acho que posso considerá-los todos, irmãos de sangue ou, mais apropriadamente, “irmãos neutrofilicos,” ao menos.

Meus agradecimentos à Karina, Elaine, Liz, Anne, Everton, Micaella, Hialy, Alan, Rachel, Pollyanna, Marli, Rodrigo, Leonardo, Carlos Morris, Muhammad, Samina, Fernanda, Lucas, Alison. Especiais agradecimentos ao prof. Dr. José Raimundo e ao Raphael Peixoto e Ricardo Guirelli, com os quais muito aprendi e devo muito.

Gostaria de destacar o meu reconhecido agradecimento ao Luciano Paulino, Rosana Melo, Wagner Fontes, Mariana Castro, Elaine Nascimento e José Raimundo Correa, co autores e colaboradores do nosso artigo, sem os quais, não teria sido possível a nossa publicação e a conclusão da nossa tese. À todos, cujo conhecimento em áreas específicas, interesse e participação efetiva na elaboração do artigo estreitaram nossa amizade, expandindo nossa admiração e respeito.

Ao prof. Dr. Fernando Galembeck do IQ Campinas-SP pela parceria, pelas discussões e utilização do MEV do instituto e, principalmente pelos momentos honrosamente compartilhados em seu laboratório. Ao prof. Antonio Carlos Guastaldi, conhecido e respeitado pesquisador na área da implantodontia, IQ Unesp Araraquara, especiais agradecimentos, extensivo aos profs. da UFSCar. Um especial agradecimento ao Luciano Paulino, pesquisador da Embrapa, recursos genéticos e biotecnologia, Brasília - DF, cuja valiosa colaboração foi imprescindível na avaliação por microscopia de força atômica, das superfícies utilizadas em nosso trabalho.

Agradeço imensamente à Neodent empresa de implantes, em nome do seu diretor presidente, Geninho Tomé, por todas as placas de titânio utilizadas neste trabalho, e cujo apoio à pesquisa destaca sua empresa como a maior do Brasil. Gostaria muito de agradecer também à prof<sup>a</sup>. Sônia Bão, pela colaboração do lab. de Microscopia, e também pelo aprendizado na área da microscopia eletrônica de varredura. À prof<sup>a</sup>. Rosana Melo, da UFJF (Juiz de Fora-MG), co autora deste trabalho, meu eterno agradecimento e admiração pela sua efetiva participação no trabalho, cujo conhecimento ficou explicitado na interpretação da morfologia celular das amostras utilizadas na pesquisa. Finalmente, meus agradecimentos a todos os profs. das disciplinas que cursei e, especiais agradecimentos aos ilustres profs. componentes da banca examinadora, Wagner Fontes, Carlos André Ricart, Antônio Carlos Guastaldi, Jaime Santana, Sônia Bão, Consuelo Lima, Fabiane Hiratsuka Veiga, Sônia Freitas e José Raimundo Correa.

Ao prof. José Raimundo Correa, do laboratório de Microscopia Eletrônica, que fique registrado a minha eterna gratidão. Seus ensinamentos foram fundamentais na compreensão da microscopia de fluorescência, pesquisa agregada na fase final da tese.

Finalizando, meus agradecimentos a todos os que, injustamente, ou por esquecimento, não foram mencionados, muito obrigado.

# Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>18</b>
1.1. Implantes e resposta inflamatória .....	18
1.1.1. Histórico .....	18
1.1.2. Neutrófilos e o processo inflamatório .....	20
1.1.3. Células e biomateriais .....	34
1.1.4. Biomoléculas, moléculas de adesão e superfícies implantares .....	36
1.1.5. Espalhamento e migração celular .....	38
1.1.6. Superfícies implantares.....	39
1.2. Microscopia eletrônica de varredura .....	40
1.3. Análise por dispersão de raio X .....	42
1.4. Microscopia de força atômica .....	43
1.5. Ângulo de contato .....	44
1.6. Citometria de fluxo .....	45
1.7. Microscopia de fluorescência.....	47
1.8. Interação de células e biomateriais.....	47
<b>2. Justificativa</b> .....	<b>49</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>50</b>
3.1. Objetivo Geral.....	50
3.2. Objetivos Específicos.....	50
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	<b>51</b>
4.1. Delineamento experimental .....	51
4.2. Separação dos neutrófilos em gradiente de percoll .....	51
4.2.1. Análise celular: pureza, viabilidade e rendimento .....	54
4.3. Preparo das superfícies de Ti .....	55
4.4. Análise das superfícies de Ti .....	55
4.4.1. Microscopia eletrônica de varredura .....	55
4.4.2. Análise por dispersão de raio-X .....	56
4.4.3. Microscopia de força atômica.....	56
4.4.4. Ângulo de contato .....	57
4.5. Exposição dos neutrófilos às superfícies de Ti .....	57
4.6. Análise das células .....	58
4.6.1. Microscopia eletrônica de varredura .....	58

4.6.2. Remoção das células: força g .....	59
4.6.3. Receptores de adesão de membrana nas superfícies dos neutrófilos ....	62
4.6.4. Microscopia de fluorescência .....	63
<b>5. Resultados .....</b>	<b>64</b>
5.1. Microscopia eletrônica de varredura das superfícies de Ti .....	64
5.2. Análise elementar por dispersão por raios-X .....	66
5.3. Ângulo de contato .....	67
5.4. Microscopia de força atômica .....	68
5.5. Remoção das células.....	70
5.6. Receptores de adesão de membrana nas superfícies dos neutrófilos.....	71
5.7. Microscopia de fluorescência.....	79
5.8. Análise morfológica dos neutrófilos .....	82
<b>6. Discussão .....</b>	<b>89</b>
<b>7. Conclusões .....</b>	<b>95</b>
<b>8. Perspectivas .....</b>	<b>96</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>97</b>

## Índice das Figuras

Fig. 1 – Mecanismo de transmigração leucocitária. ....	21
Fig. 2 - MEV - Superfície usinada 5.500x. ....	36
Fig. 3 - MEV - Superfície rugosa SLA 6.500x. ....	36
Fig. 4 - Microscópio eletrônico de varredura – Vista panorâmica. ....	41
Fig. 5 - Microscópio eletrônico de varredura – Detalhes do aparelho. ....	41
Fig. 6 - Esquema: Elétrons primários sendo removidos dos seus orbitais. ....	43
Fig. 7 - Esquema representativo de diferentes ângulos de contato. ....	44
Fig. 8 - Citômetro de fluxo - Facs Calibur BD. ....	45
Fig. 9 - Esquema do sistema fluido encarregado de direcionar as células. ....	46
Fig. 10 – SSC mostra a complexidade interna e FSC o tamanho da célula. ....	47
Fig. 11 - Delineamento experimental. ....	51
Fig. 12 - Sangue/gradiente percoll. ....	52
Fig. 13 - Início da separação, após primeira centrifugação. ....	53
Fig. 14 - <i>Pellet</i> de neutrófilos ( $2 \times 10^7$ células) contendo hemácias residuais. ....	54
Fig. 15 - PMN separados, antes da hemólise. ....	54
Fig. 16 - (A) Câmara de Neubauer. ....	55
Fig. 17 - Placas de Ti lisas (A) e rugosas (B). ....	58
Fig. 18 - Eppendorf com placa e células em suspensão, (130 $\mu$ L). ....	60
Fig. 19 - Eppendorf de 600 $\mu$ L invertido dentro do falcon de 15mL. ....	61
Fig. 20 – Esquema mostrando lâmina de vidro com placas de Ti (A e B) ....	63
Fig. 21 - MEV Placa lisa, 160 x. ....	64
Fig. 22 - MEV Placa lisa, 1.400x. ....	65
Fig. 23 – MEV Placa rugosa, 160x. ....	65
Fig. 24 - MEV Placa rugosa, 1.400x. ....	66
Fig. 25 - Gráfico EDX - Composição química elementar - placa lisa. ....	66
Fig. 26 - Gráfico EDX - Composição química elementar - placa rugosa. ....	67
Fig. 27 - Angulo de contato. Placa rugosa 30,10° e placa lisa 45,20°. ....	67
Fig. 28 - Placa lisa 2D. ....	68
Fig. 29 - Placa lisa 3D. ....	68
Fig. 30 - Placa rugosa 2D. ....	69
Fig. 31 - Placa rugosa 3D. ....	69
Fig. 32 – Gráfico das medidas de rugosidade obtidas por MFA. ....	70



Fig. 33 - Número de células removidas das placas x tempo de incubação.....	71
Fig. 34 - Porcentagem de células com CD-62L x tempo de incubação.....	72
Fig. 35 - Intensidade de CD-62L x tempo de incubação. ....	73
Fig. 36 - Porcentagem de células com CD-11b x tempo de incubação.....	73
Fig. 37 - Intensidade de CD-11b x tempo de incubação. ....	74
Fig. 38 - FACs controle negativo - 30 min. ....	75
Fig. 39 – FACs controle positivo- (PMA) 30 min.....	75
Fig. 40 – FACs Placa lisa 30 min. ....	76
Fig. 41 – FACs – Placa rugosa 30 min.....	76
Fig. 42 - FACs controle negativo 2 horas. ....	77
Fig. 43 - FACs controle positivo (PMA) 2 horas. ....	77
Fig. 44 – FACs Placa lisa 2 horas ....	78
Fig. 45 – FACs Placa rugosa 2 horas.....	78
Fig. 46 - Adesão de neutrófilos em substrato metálico liso (Ti) – 5 min .....	80
Fig. 47 - Adesão de neutrófilos em substrato metálico rugoso (Ti) – 5 min.....	82
Fig. 48 - Microscopia eletrônica de varredura: polimorfonucleares neutrófilos.....	84
Fig. 49 - Área de adesão dos PMN em ambas as superfícies. ....	85
Fig. 50 - Gráfico da área de adesão celular nas superfícies lisas e rugosas. ....	85
Fig. 51 - Projeções do citoplasma de PMNs neutrófilos em aumento de 12.000x....	86
Fig. 52 - MEV Morfologia celular: placa lisa, tempo 0 e 1700x.....	87
Fig. 53 - MEV Morfologia celular: placa rugosa, tempo 0 e 1800x. ....	87
Fig. 54 - MEV Morfologia celular: placa lisa, tempo 2h e 1800x.....	88
Fig. 55 - MEV Morfologia celular: placa rugosa, tempo 2h e 1800x. ....	88
Fig. 56 - MEV Morfologia celular: placa lisa, tempo 2h e 5000x.....	88
Fig. 57 - MEV Morfologia celular: placa rugosa, tempo 2h e 5000x. ....	88

## Índice das Tabelas

Tabela 1 - Gradientes de percoll. ....	52
Tabela 2 - Variação na RPM, tempo e altura das amostras .....	62
Tabela 3 – Marcadores e tempo de interação dos neutrófilos - placas lisas .....	63
Tabela 4 - Marcadores e tempo de interação dos neutrófilos - placas rugosas .....	63
Tabela 5 - Parâmetros de rugosidade calculados por MFA. ....	69

## Símbolos e Abreviações

• AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
• ALI	Lesão pulmonar aguda
• ALP	Fosfatase alcalina
• ANOVA	Análise de variância
• BSA	Albumina sérica bovina
• C3a	Resultado da clivagem do complemento C3
• C5a	Resultado da clivagem do complemento C5
• C5b-9	Complexo de complemento terminal inserido nas membranas celulares, constituído por proteínas C5b, C6, C7, C8 e C9
• CAM-1	Moléculas de adesão celular
• CD-11b	Receptor de membrana, fração da Mac-1
• CD-16	Receptor Fc de baixa afinidade, liga-se à porção Fc do Ac IgG
• CD-32	Glicoproteína transmembrana com 40kDa
• CD-62L	Selectina leucocitária ou L-selectina
• CD-64	Proteína integral de membrana
• CellQuest	Programa utilizado na citometria de fluxo
• CPD	Ponto crítico-MEV
• CpTi	Titânio comercialmente puro
• DAPI	4,6 Diamidino-2-fenilindol
• ECs	Células endoteliais
• EDX	Energia dispersada por Rx
• FACs	Citometria-separação de células por fluorescência
• Faloidina	Marcador de actina
• Fator-X	Proteína plasmática relacionada com o processo de coagulação
• Fc $\gamma$ R	Fração constante do receptor de adesão
• FEG	Canhão para emissão de campo
• FITC	Isotiocianato de fluoresceína
• fMLP	Nformil-metionil-leucil-fenilalanina
• Força g	Método de separação celular por centrifugação
• FSC	Dispersão frontal de luz laser
• GMCSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos

- GMP-140 Proteína granular de membrana
- HBSS Solução salina balanceada de Hanks
- iC3b Proteína resultante da clivagem do complemento C3b com capacidade de opsonização
- ICAM-1 Molécula de adesão intercelular
- IgG Imunoglobulina G
- Il-1 Interleucina-1
- Il-8 Interleucina-8
- LDH Diidrogenase láctica
- LFA-1 Antígeno associado à função leucocitária
- LPC Lisofosfatidilcolina
- LPS Lipopolissacarídeo
- LTB4 Leucotrieno
- Mac-1 Sinonímia: CD-11b / CD18, é um receptor de adesão ( $\alpha$ m integrina leucocitária), encontrada nos grânulos específicos dos neutrófilos
- MET Microscopia eletrônica de transmissão
- MEV Microscopia eletrônica de varredura
- MFA Microscopia de força atômica
- PAF Fator ativador de plaquetas
- PBS Solução tamponante de fosfato
- PECAM-1 Molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais
- Percoll Solução para separação por gradiente de densidade
- PMA 13-acetato de forbol éster 12-miristato
- PMNs Polimorfonucleares neutrófilos
- P-Selectina Selectinas plaquetárias
- PSGL-1 Selectina plaquetária glicoproteína-ligante
- Rho GTP Família de proteínas de ligação guanina-nucleotídeo formadas por Rho, Rac e Cdc42
- ROS Espécies reativas de oxigênio
- R-PE Fico-eritrina, proteína fluorescente
- SLA Tratamento de superfície com jato de areia e ataque ácido
- SSC Dispersão lateral de luz laser

- TCR Tubo de raio catódico
- TEM Migração trans- endotelial
- Ti Titânio
- TiAl6V4 Liga composta por Ti, Al e V
- TiO<sub>2</sub> Óxido de titânio
- TNF $\alpha$  Fator de necrose tumoral
- Triton-X Permeabilizador
- Turck Método de coloração para verificação do rendimento celular
- WASP Síndrome de Wiskott-Aldrich, rara doença imunológica recessiva ligada ao cromossomo X
- Wright Método de coloração para verificação da pureza celular

## Resumo

A estabilidade do titânio (Ti) e sua alta resistência à corrosão, fizeram do mesmo o elemento de escolha na implantodontia e estão relacionadas, dentre outros fatores, com a camada natural de óxido na sua superfície. Vários tratamentos tem sido utilizados para modificar sua topografia e energia de superfície, no intuito de promover melhor adesão, migração e proliferação celular, diminuindo o tempo necessário para a osteointegração. Diferentes superfícies provavelmente influenciam de maneira distinta a resposta inflamatória e eventos celulares como ativação de leucócitos, cicatrização e osteogênese. A adesão de plaquetas e geração de fibrina, bem como a ativação do sistema complemento, resultam na ativação e recrutamento de neutrófilos. Durante a colocação de um implante, a adsorção de pequenos íons e proteínas plasmáticas ocorre na superfície, sendo responsável por subseqüentes respostas celulares. Portanto, a compreensão do papel dos neutrófilos humanos nas interações que ocorrem nas superfícies implantares, e a influencia da composição elementar bem como, dos diversos tratamentos aplicados a essas superfícies é de grande importância. A otimização para uso clínico dos materiais utilizados na confecção de implantes requer modificações controladas de suas superfícies. No presente, as relações entre tais superfícies e sua reatividade com os tecidos, bem como sua integridade a longo prazo, são pouco conhecidos.

O objetivo do presente estudo foi comparar a resposta de neutrófilos interagindo diretamente com duas distintas superfícies de Ti em diferentes tempos de incubação. Neutrófilos humanos foram separados e colocados em contato com discos de Ti, lisos e rugosos. Para a análise da adesão celular foram utilizadas a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a citometria de fluxo (Facs). A morfologia e o resultado do uso de marcadores de adesão revelaram sinais de ativação dos neutrófilos por ambas as superfícies. As características morfológicas nas duas superfícies mostraram progressivas alterações durante os primeiros 120 minutos da interação. Utilizou-se também a microscopia de fluorescência e marcadores como o Dapi, Faloidina e anti CD-62L para caracterizar, respectivamente, o núcleo celular, o citoesqueleto actínico e receptores de membrana. Não houve correlação entre a força de adesão, alterações morfológicas,

complexidade do citoesqueleto e expressão dos marcadores CD-62L e CD-11b, considerados, após os tempos de interação das células com as superfícies.

## Abstract

The stability and high corrosion-resistance of the titanium (Ti) makes it, the element of choice in implantology and its related, among other factors, with the natural oxide layer that covers the Ti surface. Many treatments have been used to modify its topography and surface energy in order to promote better cell adhesion, migration and proliferation shortening the time necessary to the osseointegration. Different surfaces probably influence distinctly the inflammatory responses and cellular events as leukocyte activation, healing and osteogenesis. The platelet adhesion and fibrin generation as well as the complement activation results in the neutrophil recruitment and activation. At the time of an implant placement plasma proteins and ions adsorb to the surface and are responsible for subsequent cellular responses. So the comprehension of the human neutrophils role on the interactions network that occurs on the implant surfaces and the influence of the elemental composition as well as different surface treatments applied are of great importance. The optimization for clinical use of the materials used to construct implants need controlled modifications on its surfaces. At the present the relationship between these surfaces and its reactivity with tissues for a long period of time are little known.

The aim of the present study was to compare the response of neutrophils interacting with two different Ti surfaces and different time contact. Isolated human neutrophils were placed into contact with Ti discs, which had been rendered as "smooth" or "rough" following different surface treatments. Scanning electron microscopy and flow cytometry were used to analyze the cell adhesion to the surfaces and the exposure of membrane proteins such as CD-62L and CD-11b. Topographic roughness was demonstrated as higher for the SLA treated surfaces, measured by atomic force microscopy and elemental analysis was performed by energy dispersive X-ray, showing a similar composition for both surfaces. The cell morphology and adhesion marker results revealed signs of neutrophil activation by either surface, with different neutrophil morphological characteristics being observed between the 2 surface types and progressive morphologic changes during the first 120 min of interaction. Topographic analyses were also performed by the use of atomic force microscopy. Fluorescence microscopy (AFM) and markers as Dapi, Faloidin and CD-



62L were also utilized in order to characterize the cellular nucleus, actin cytoskeleton and membrane receptors.

There is no correlation between adhesive forces, morphological changes, cytoskeletal complexity and marker expression as anti CD-62L or CD-11b on the evaluated interaction time of the cells with the surfaces.

# 1. Introdução

## 1.1. Implantes e resposta inflamatória

### 1.1.1. Histórico

Em 1940 surgiram os primeiros relatos de que o Ti era bem tolerado quando implantado no tecido ósseo, apresentando tendência a crescer, ao interagir com o referido metal (Bothe *et al.*, 1940). Desde essa época, sistemas de implantes de Ti têm sido utilizados como substitutos para o tecido ósseo (Leventhal, 1951; Albrektsson *et al.*, 1983). A razão para o sucesso da cicatrização nos implantes de titânio não é bem compreendida, mas alguns pontos chave têm sido identificados. Um desses pontos é a alta estabilidade, resistência à corrosão e passividade da camada de óxido que cobre a superfície de Ti. Além do mais, apesar do Ti induzir uma resposta do tipo corpo estranho quando implantado, a cicatrização assemelha-se a um processo cicatricial natural.

Na década de 50, experimentos realizados por Brånemark e colaboradores confirmaram que o tecido ósseo crescia em contato com Ti. A partir de então adquiriu-se conhecimento sobre biologia óssea necessário à compreensão do processo da osteointegração (Brånemark, 1993). Após a colocação de um implante na mandíbula era necessário um período de seis meses (ou oito meses na maxila), para que ocorresse a osteointegração e o mesmo pudesse receber carga mastigatória. Posteriormente, modificações no “design” do implante e, principalmente, na sua topografia, fizeram com que esse tempo fosse reduzido. Atualmente são necessários cerca de três meses, isso sem considerar os implantes de carga imediata (Testori, 2003). O fenômeno da osteointegração ou seja, interação direta osso/implante tem sido melhor compreendido e as pesquisas voltam-se agora para os eventos que ocorrem após a colocação dos implantes e seu imediato contato com o plasma (Nygren *et al.*, 1997). O tecido ósseo é formado tardiamente após a colocação dos implantes, já na fase regenerativa do processo cicatricial, ocorrendo em duas etapas: osteoindução, representado pela conversão fenotípica de células de tecido mole em células ósseas, ou seja, matriz óssea desmineralizada ou proteínas morfogênicas ósseas, por estímulo apropriado; e osteogênese, sendo este, a formação de tecido mineralizado por osteoblastos.

As propriedades das superfícies implantares dependem da energia de superfície e da rugosidade superficial. Teoricamente a rugosidade é capaz de estabelecer maior união biomecânica com o osso periimplantar se comparado com implantes com a mesma forma ou “designe”, porém, com superfície lisa ou polida (Baier *et al.*, 1984).

Em um experimento, foram utilizados sete coelhos nos quais, foram colocados vinte e oito implantes. Metade dos implantes de Ti comercialmente puro (cpTi), tiveram suas superfícies tratadas por eletropolimento e os outros implantes foram apenas usinados. Seis semanas após, os animais foram sacrificados obtendo-se cortes com 10 µm de espessura evidenciando a interface de contato osso/titânio. A análise histológica mostrou interação direta osso/titânio de 60% para as duas superfícies, porém, a média do torque para a remoção dos implantes com superfície rugosa foi de 26.4 Ncm, enquanto para implantes com superfície lisa foi de 17.2 Ncm (Lars *et al.*, 1988).

Não é conhecido precisamente como as superfícies implantares contribuem ou modificam o processo da formação óssea. Materiais de implante cerâmicos ou metálicos não são osteogênicos. As superfícies dos implantes atuais não têm propriedades osteoindutoras, processo que suporta a mitogênese de células mesenquimais indiferenciadas, levando a formação de células osteoprogenitoras a criar novo osso. As superfícies dos materiais e implantes diferem consideravelmente na capacidade osteoindutora, processo que envolve a invaginação e proliferação dos tecidos perivascularares e células osteoprogenitoras, do leito receptor para o implante ou enxerto. (Einhorn, 1995).

Ainda sobre a rugosidade superficial, vários autores afirmam que a mesma tem mostrado afetar a diferenciação e proliferação osteoblástica. O jateamento e o ataque ácido podem aumentar a formação óssea na superfície implantar. Além do que, uma das mais efetivas superfícies (SLA) tem sido conseguidas com jateamento seguido de ataque ácido e nenhum efeito negativo na adesão celular tem sido mostrado. O jateamento de areia pode ser realizado utilizando-se tanto partículas médias ou grandes de óxido de alumínio ( $Al_2O_3$ ). A literatura mostra que no ataque ácido pode se empregar tanto ácido clorídrico (HCl) ou uma mistura de HCl e ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) ou ainda ácido hidrófluorídrico a (2%) e ácido nítrico a 10%, HF/ $HNO_3$ . Além de aumentar a rugosidade superficial, o jateamento, seguido do ataque ácido pode remover contaminantes e aumentar a reatividade do metal. No

entanto, muitos clínicos têm tirado conclusões diversas desses achados experimentais, ignorando vários relatos sobre a pobre correlação entre achados animais e resultados clínicos (Bowers, 1992; Martin *et al.*, 1995).

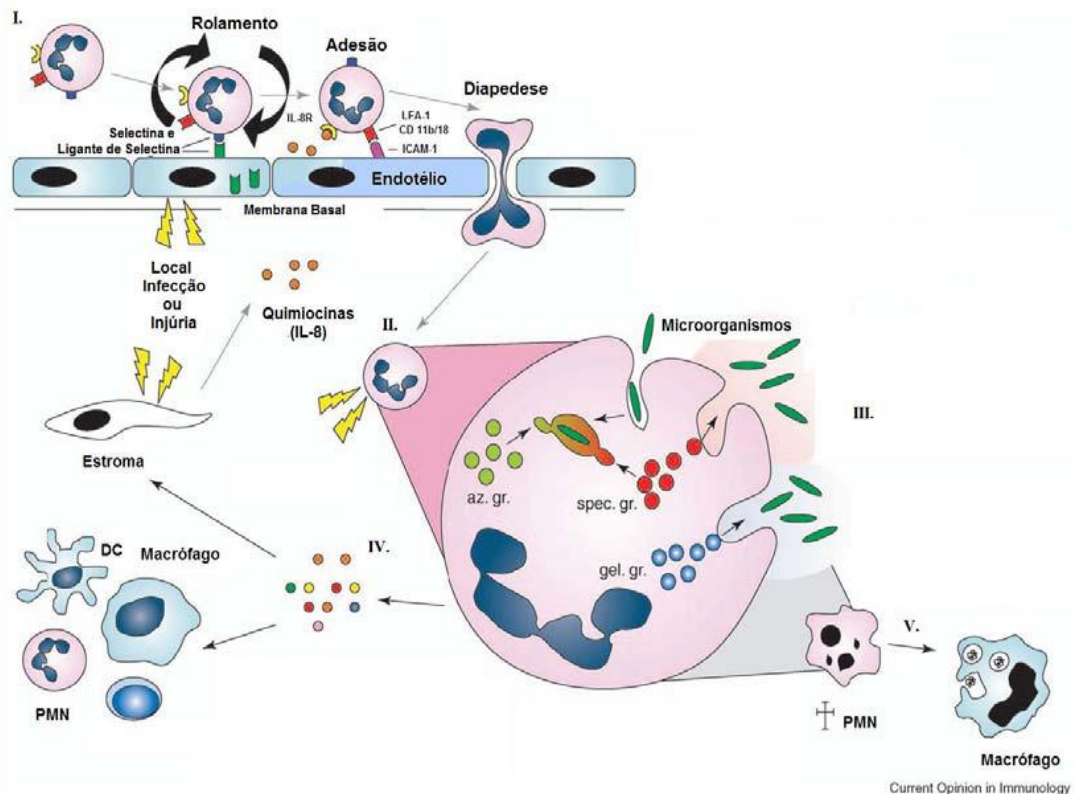
### **1.1.2. Neutrófilos e o processo inflamatório**

O entendimento dos mecanismos da migração dos leucócitos aumentou muito nos últimos anos. Embora apenas na última década, a primeira molécula de adesão tenha sido caracterizada, atualmente o nosso conhecimento inclui a descrição molecular para numerosas interações entre ligantes e receptores e a descoberta de novas famílias de citocinas e quimiocinas. O conhecimento do importante papel das vias de adesão nas doenças como, AIDS, aterosclerose, câncer e síndrome inflamatória, despertou a atenção dos pesquisadores. Apesar das pesquisas terem respondido algumas questões, elas também suscitaram alguns desafios. De fato, o conhecimento sobre a transmigração endotelial de leucócitos (TEM), retrata um complexo fenômeno com vários mecanismos e pontos de controle que dependem do sítio de migração, tipo celular, estímulo inflamatório inicial e presença ou ausência de diversos mediadores celulares solúveis. O paradigma da rolagem, adesão e diapedese permanece verdadeiro, entretanto, o número de variáveis envolvendo tal processo tem aumentado consideravelmente (Ratner, 1993).

Os neutrófilos são os leucócitos mais numerosos do sangue periférico compreendendo cerca de 40% a 70% em condições normais. A vida média dessa célula na circulação é de 6 a 10 horas, porém, após a ativação e migração para o tecido, a vida média passa a ser de 2 a 6 dias, retardando assim, a apoptose. Ativação dos neutrófilos ocorre após algum estímulo e possibilita a migração celular para o local da inflamação e a destruição do patógeno, sendo esse mecanismo de ativação fundamental na imunidade inata (Kuijpers, 2001).

O sistema imune controla uma série de células que tem a finalidade de defender o organismo. Os neutrófilos participantes desse processo (células efetoras), migram rapidamente para o local da infecção ou injúria, após a detecção de sinais quimioatraentes. A migração é orientada em direção ao gradiente quimiotático que atrai a célula para o rolamento sobre o endotélio, adesão e diapedese e guia a movimentação do neutrófilo no tecido (Wagner e Roth, 2000; Theilgaard-Monch, Porse *et al.*, 2006).

Ao chegar ao local injuriado, o neutrófilo reconhece o agente causador da injúria por receptores de membrana, fazendo com que haja o engolfamento da partícula ou microorganismo e sua conseqüente destruição por meio das espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteínas proteolíticas e antimicrobianas. Após esse processo, os neutrófilos sofrem apoptose e são fagocitados pelos macrófagos (Figura 1) (Theilgaard-Monch, Porse *et al.*, 2006).



**Fig. 1 – Mecanismo de transmigração leucocitária.**

Defesa imune inata mediada por neutrófilos em resposta à infecção ou injúrias. I. Saída do neutrófilo da circulação sangüínea (rolamento, adesão e diapedese); II. Ativação do neutrófilo; III. Fagocitose, destruição, degradação e liberação de espécies reativas de oxigênio (exocitose); IV. Liberação de citocinas com conseqüente ativação de outras células; V. Apoptose dos neutrófilos e fagocitose dos mesmos pelos macrófagos. Abreviaturas: az. gr.-grânulos azurofílicos, spec. gr.-grânulos específicos, gel. gr.-grânulos de gelatinase, ICAM-1-antígeno associado a função dos linfócitos 1, LFA-1-antígeno associado a função leucocitária, DC-células dendríticas e PMN-polimorfonuclear neutrófilo. Modificação posterior à Theilgaard-Monch, Porse *et al.*, 2006.

A primeira fase da resposta inflamatória é a liberação de quimiotáticos, tais como: C5a, mediadores lipídicos e quimiocinas pelos macrófagos, células teciduais, células-T e bactérias. As quimiocinas são induzidas por citocinas pró-inflamatórias liberadas por tecidos, macrófagos, células-T e bactérias, após a invasão de um microorganismo ou partículas ou após a lesão tecidual. A quantidade e a duração da

reação inflamatória depende do estímulo recebido pelas células pró-inflamatórias. Essas diferenças são percebidas na adesão, nos tipos de quimioatraentes liberados, nas diferentes expressões de receptores, nos tipos leucocitários envolvidos, na liberação dos grânulos, na presença ou ausência da fagocitose e na regulação da apoptose (Kuijpers, 2001).

Durante a infecção bacteriana, o lipopolissacarídeo (LPS) e o formil-metionil-leucilfenilalanina (fMLP) são os agentes ativadores dos neutrófilos realizando a função de quimioatraentes. Quando os neutrófilos chegam ao local da infecção, as bactérias geralmente estarão opsonizadas, o que orienta os neutrófilos a realizar a fagocitose rapidamente, destruindo-as. Logo em seguida, ocorre a apoptose dos neutrófilos. Em uma inflamação sem infecção, outras quimiocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas, fator de agregação plaquetária (PAF), são liberadas pelos tecidos e leucócitos após injúrias teciduais, ocorrendo a quimiotaxia e a liberação dos grânulos sem a fagocitose. Nos dois tipos de processo inflamatório (infeccioso ou não), o equilíbrio entre recrutamento, liberação de substâncias tóxicas e apoptose dos neutrófilos é de fundamental importância para que o agente inflamatório seja erradicado e a resposta seja gradualmente interrompida. Algumas doenças são agravadas pela perda desse equilíbrio, como bacteremia, que pode evoluir a choque séptico; a coagulação intravascular disseminada, ou a isquemia seguida de reperfusão que pode evoluir para a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, que, por sua vez, pode apresentar como complicação a síndrome da angústia respiratória aguda e como possível consequência, a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (Kuijpers, 2001).

### **Mecanismos de estímulo e ativação dos neutrófilos**

A resposta inflamatória é um processo complexo que ativa uma série de células, principalmente células do sistema imune. Os neutrófilos, células efetoras da resposta inflamatória, têm sido bastante estudados. Esses estudos têm demonstrado que os neutrófilos são ativados, mas que, na sua grande maioria, essas células passam por uma fase de estimulação, uma fase intermediária entre repouso e ativação, evidenciando que a transição entre esses estados não ocorre de forma “tudo ou nada”. Vários autores concordam com a existência de três fenótipos distintos: repouso ou quiescente, estimulado e ativado (Botha, Moore *et al.*, 1995a; Swain S.D. , 2002; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

Os neutrófilos quiescentes são aqueles que circulam livremente na corrente sangüínea, não aderem ao endotélio e possuem a morfologia arredondada. O fenótipo estimulado é observado na primeira etapa de um processo inflamatório. Os neutrófilos expõem receptores para que ocorra a adesão e, posteriormente, a diapedese entre as células endoteliais, produzindo poucos radicais de oxigênio e a sua morfologia é modificada para que ocorra a migração. No estado ativado, todos os processos que ocorrem nos neutrófilos estimulados são percebidos, porém em maior intensidade, além de ocorrer a fagocitose. Alguns ativadores neutrofílicos podem ser também estimuladores como fMLP, LPS e PMA, tendo como diferença a concentração para a produção de seus efeitos. O PMA é considerado o ativador mais potente, pois ativa os neutrófilos ao máximo (Botha, Moore *et al.*, 1995a; Siddiqui, English *et al.*, 1995; Vulcano, Alves Rosa *et al.*, 1998; Swain S.D. , 2002; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

Os fenótipos podem ser considerados estágios pelos quais os neutrófilos passam para chegar à ativação total. Isso é percebido quando temos um estado estimulado e o neutrófilo encontra mais um estímulo que o torna ativado. Também é possível o retorno ao estado quiescente a partir do estado estimulado (Botha, Moore *et al.*, 1995b; Kitchen, Rossi *et al.*, 1996).

O estado estimulado, comumente conhecido como “primed”, é uma etapa que potencializa uma futura ativação dos neutrófilos. Muitos agentes são estimuladores de neutrófilos, tais como citocinas, mediadores lipídicos, grupos de hormônios de crescimento celular, dentre outros. Os agentes estimuladores mais estudados são o LPS, liberado pelas bactérias Gram-negativas e o PAF, agente endógeno animal. O neutrófilo estimulado por PAF pode se tornar a célula efetora na patogênese de doenças, tais como síndrome da resposta inflamatória sistêmica, síndrome da angústia respiratória aguda e falência múltipla dos órgãos (Swain S.D., 2002).

Na maioria dos processos inflamatórios é desencadeado primeiro o processo estimulatório dos neutrófilos (primeiro hit) e, em seguida, é atingido o estado ativado pela ligação de um segundo ativador, o que chamamos de segundo hit. Na patogênese da inflamação, injúrias teciduais e falência múltipla dos órgãos e, mais especificamente, no trauma é encontrada a estimulação endógena por PAF, entre 3 a 6 horas após o trauma e permanência de até 24 horas. Na estimulação, ocorre a ativação da montagem do complexo NADPH oxidase e liberação de pequenas quantidades de radicais de oxigênio (desgranulação); exposição de moléculas de

adesão ao endotélio, conseqüente migração, produção e liberação de lipídeos bioativos, regulação de receptores de superfície, polimerização de actina, eventos de fosforilações, ativação de sinais de tradução de proteínas e mudança na taxa de apoptose (Botha, 1995b; Lee, Hybertson *et al.*, 2002; Swain S.D., 2002).

O segundo hit pode ser produzido pela ligação de LPS ou fMLP (produtos bacterianos) ao receptor específico ativando os neutrófilos com conseqüente intensificação da produção e liberação de espécies reativas de oxigênio e da fagocitose (Botha, 1995b).

A conseqüência desse processo em dois “hits” é o prolongamento do processo inflamatório mesmo na ausência ou à distância do desencadeante (lesão ou infecção) podendo causar danos teciduais graves e levar à síndrome da angústia respiratória e conseqüente falência múltipla dos órgãos (Botha, 1995b).

### **Fases de Ativação**

Como já foi comentado, os neutrófilos possuem 3 fenótipos: repouso ou quiescente, estimulado e ativado. Esses estágios ou fases da ativação dos neutrófilos são de fundamental importância na modulação da resposta na imunidade inata. Na primeira fase, de repouso, encontramos os neutrófilos na circulação sanguínea, no estágio estimulado, realizando rolamento sobre o endotélio, diapedese e migração e no estágio ativado encontramos os neutrófilos onde temos a maior concentração de ativadores e patógenos. Essa separação é didática, podendo ser encontrados neutrófilos estimulados no local injuriado, como na lesão pulmonar aguda (ALI) (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

## **I - Características dos neutrófilos em repouso ou quiescentes**

### **a) Citosol**

As subunidades da NADPH oxidase: p40<sup>PHOX</sup>, p47<sup>PHOX</sup> e p67<sup>PHOX</sup> estão no citosol e estudos têm mostrado que há dimerização entre p67<sup>PHOX</sup> e p47<sup>PHOX</sup> e entre p40<sup>PHOX</sup> e p67<sup>PHOX</sup> e trimerização entre p67<sup>PHOX</sup>, p47<sup>PHOX</sup> e p40<sup>PHOX</sup>. Têm-se ainda Rac2 inativada com a ligação do GDP e inibidores de dissociação Rho-GDP (RHOGDI) (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005; Condliffe, Webb *et al.*, 2006).

### **b) Membrana**



Na membrana plasmática encontra-se uma pequena concentração de citocromo b558 (p22<sup>PHOX</sup> e gp91<sup>PHOX</sup>) juntamente com Rap1A (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

### c) Grânulos

A maior parte do citocromo b558 está ligado à membrana granular das vesículas secretoras e dos grânulos específicos (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

## II - Neutrófilos estimulados

O fenótipo estimulado é marcado pela mudança de neutrófilos não aderentes para aderentes e liberação de pequenas quantidades de ROS. A quantidade de ROS é aumentada mais ainda após um segundo estímulo (Botha, 1995b; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005). Muitos agentes são estimuladores. Os estimuladores podem ser divididos em dois tipos: rápidos, agem em 3-5 minutos e geralmente envolvem a tirosina quinase (PAF, LTB<sub>4</sub>, C5a e lisofosfatidilcolina, LPC) e os de ação lenta, que demoram 15-60 minutos para manifestar o seu efeito como o LPS, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), GM-CSF e IL-8, (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005)

### a) Citosol e membrana

A ligação de agentes estimuladores como PAF, C5a, IL-8, LPC e LPS desencadeia a montagem parcial do complexo NADPH oxidase que durará até 2 horas, antes de um segundo estímulo. Estimuladores de longa duração fosforilam e translocam a p47<sup>PHOX</sup> para membrana plasmática, porém o TNF- $\alpha$  fosforila a p47<sup>PHOX</sup> parcialmente, não ocorrendo a translocação. O PAF fosforila a p67<sup>PHOX</sup> ocorrendo a translocação e fosforila p40<sup>PHOX</sup> e Rac2, mas não p47<sup>PHOX</sup>. Os neutrófilos incubados com LPS entre 30 e 60 minutos aumentam a associação do citocromo b558 com a membrana plasmática e a fosforilação de p47<sup>PHOX</sup>, mas não p67<sup>PHOX</sup>, p40<sup>PHOX</sup> e Rac2. No entanto, agentes estimuladores, tais como homocisteína, angiotensina II, zimosan opsonizado (OpZ) e estimulação por meio da  $\beta$ 2-integrina, fosforilam e translocam para membrana a p67<sup>PHOX</sup> e p47<sup>PHOX</sup>. A liberação do ânion superóxido pelo complexo NADPH oxidase parece ocorrer após a montagem completa, porém, na estimulação dos neutrófilos, essa montagem é parcial. Mas, como foi visto, a estimulação de outras vias, por exemplo, estimulação da  $\beta$ 2-integrina, fosforila e monta outras subunidades da NADPH oxidase, diferentes dos estimuladores como o

PAF, podendo ocorrer a montagem completa (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005). Juntamente com a montagem do complexo NADPH oxidase, outras proteínas são ativadas levando a diversas funções como transcrição, tradução e fosforilações, como por exemplo, a fosforilação da família das MAP quinases, principalmente p38 MAPK e Erk1/2. O aumento da concentração de  $Ca_{2+}$  no citosol, devido à estimulação, é necessário para ativação de proteínas dependentes de  $Ca_{2+}$ , tais como algumas subunidades da PKC, proteínas que atuam no citoesqueleto e na desgranulação. A reorganização da actina, principalmente a F-actina é necessária para a movimentação dos grânulos e migração (Chen, Lin *et al.*, 2005; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

#### **b) Vesículas secretoras e grânulos**

As vesículas secretoras e os grânulos de gelatinase desgranulam para o meio extracelular realizando a fusão com a membrana plasmática, assim expõem  $\beta 2$ -integrina mediando a diapedese e a migração pelo tecido. Estudo com a estimulação feita pelo LPS demonstrou a fusão dos grânulos específicos e azurofílicos no fagossoma, aumento na quantidade do citocromo b558 na membrana plasmática e a desgranulação bem evidente (Faurischou e Borregaard, 2003; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

### **III - Neutrófilos ativados**

A ativação resulta na completa montagem e ação do complexo NADPH oxidase. Agentes comumente ativadores são o PMA e o fMLP. Alguns estimuladores podem ser ativadores com o aumento na concentração, porém, em alguns casos, esse aumento não é fisiológico (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

#### **a) Citosol**

A ativação requer a fosforilação dos resíduos de tirosina e serina da  $p47^{PHOX}$ ,  $p67^{PHOX}$  e  $p40^{PHOX}$  via quinases, tais como PKC, quinase p21 ativada, p38 MAPK, PI3-K e proteína quinase ativada PA, seguido por translocações para a membrana plasmática e granular. A ativação do complexo NADPH oxidase, ocorre após sua montagem (Chen, Lin *et al.*, 2005; Groemping e Rittinger, 2005; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

## **b) Membrana**

Na ativação, o complexo NADPH oxidase é montado tanto na membrana plasmática como nos grânulos. Há intensa produção de ROS e proteínas são fosforiladas. A F-actina liga-se ao domínio PX da p40<sup>PHOX</sup> e da p47<sup>PHOX</sup>, subunidades do complexo NADPH presentes na membrana, via fosfoinositol, e assim a F-actina é reorganizada permitindo a formação de pseudópodes e a fagocitose (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

## **c) Grânulos**

Os grânulos específicos e azurofílicos se fundem ao fagossomo liberando o seu conteúdo, que contribui para a destruição do patógeno. Também há desgranulação no meio extracelular e a presença de ânion superóxido (Faurischou e Borregaard, 2003; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

## **Receptores de adesão e migração dos neutrófilos**

Conforme visto anteriormente os neutrófilos possuem uma grande diversidade de receptores, dentre eles estão receptores acoplados à proteína G, onde PAF e fMLP se ligam produzindo, respectivamente, estimulação e ativação; receptores Toll-like, principalmente o receptor 4, onde liga-se o LPS e receptores associados a migração, fagocitose e apoptose (Becker, 1987; Alpin, Howe *et al.*, 1998; Andonegui, Bonder *et al.*, 2003; Fernandes, Passos *et al.*, 2005).

Moléculas quimiotáticas, como PAF, leucotrieno B4 (LTB4), fMLP e produto do sistema complemento C5a, induzem a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos e células endoteliais, com conseqüente migração (Wagner e Roth, 2000; Kuijpers, 2001).

Os neutrófilos circulantes são estimulados ou ativados por algum quimioatraente e começam a se movimentar em direção ao gradiente quimiotático. Essa movimentação começa pela exposição de receptores (L-selectina, PSGL-1 e ESL-1) na membrana dos neutrófilos e são mediados por selectinas, conhecidas como L-selectina, P-selectina e E-selectina. A L-selectina exposta na membrana dos neutrófilos adere ao receptor sialomucina sulfatada no endotélio, assim como a P-selectina e a E-selectina exposta na membrana do endotélio aderem a receptores PSGL-1 e ESL-1, respectivamente, nos neutrófilos. Essas adesões são fracas, mas fundamentais para diminuir a velocidade dos neutrófilos sobre o endotélio. Esse

processo é chamado de rolamento. Vários autores acreditam que, durante o rolamento, a L-selectina envia sinais de tradução que estão relacionados à mobilização de integrinas, que irão agir na adesão firme dos PMN ao endotélio, porém esse mecanismo ainda é desconhecido. As integrinas são externalizadas após a ativação e estimulação dos neutrófilos (Crockett-Torabi, 1998; Wagner e Roth, 2000; Burg e Pillinger, 2001).

As integrinas são grupos de glicoproteínas transmembrânicas encontradas nos PMN que intermediam a adesão célula-célula e adesão à matriz. A família das integrinas possui duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Existem 16 tipos de subunidades  $\alpha$  e 8 tipos de subunidades  $\beta$  constituindo 23 receptores conhecidos. Na adesão firme do PMN ao endotélio, há a participação de duas integrinas: antígeno de macrófago 1 (Mac-1;  $\alpha M\beta 2$ ; CD-11b/CD-18) e antígeno associado à função dos linfócitos 1 (LFA-1;  $\alpha L\beta 2$ ; CD-11a/CD-18). Os ligantes endoteliais Mac-1 têm sítios de reconhecimento específicos para fibrinogênio, fator X de coagulação, heparina, LPS, proteína do complemento C3i e glicosaminoglicano. Assim, o neutrófilo pode agir em várias situações durante uma inflamação, podendo ligar-se ao fibrinogênio e ao fator X da coagulação; agir em uma endotoxemia fagocitando, liberando radicais de oxigênio; ativar a cascata do complemento e aumentar a concentração de ligantes na membrana do endotélio. No endotélio, ocorre a exposição de moléculas de adesão como ICAM-1 (CD-45) e 2 que se ligará a MAC-1 ou LFA-1, para a adesão firme. O ICAM-1 pode ativar o citoesqueleto das células endoteliais para que os neutrófilos sejam puxados, favorecendo a diapedese. Os PMN também podem expressar  $\beta 1$  integrina (VLA-4) e ligar-se à VCAM-1 do endotélio, como demonstrado por estudos *in vitro* (Wagner e Roth, 2000; Burg e Pillinger, 2001).

O evento posterior à adesão firme é a diapedese (migração dos PMN entre as células endoteliais) e a transmigração (movimentação dos neutrófilos na matriz extracelular). Durante a diapedese os neutrófilos passam por um orifício que se abre entre 3 células endoteliais, sendo essa migração mediada pela molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais 1 (PECAM-1; CD-31) e ICAMs (Su, Chen *et al.*, 2000; Wagner e Roth, 2000; Burg e Pillinger, 2001).

A transmigração é menos conhecida que a diapedese e a adesão, mas sabe-se que os leucócitos se ligam a componentes da matriz como colágenos, fibronectinas, vitronectinas e laminina via  $\beta 1$  integrinas. As integrinas  $\beta 1$  VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ ) e VLA-6( $\alpha 6\beta 1$ ) ligam-se respectivamente a fibronectina e laminina (Su, Chen

*et al.*, 2000; Wagner e Roth, 2000). A VLA-4( $\alpha 4\beta 1$ ) e a VLA-9( $\alpha 9\beta 1$ ) interagem com a fibronectina e VCAM-1, ligando-se também à proteína tenacina da matriz. Juntamente com as ligações das integrinas à matriz, o citoesqueleto do neutrófilo sofre modificações e polimerização levando à movimentação. Os grânulos são liberados causando destruição parcial da matriz, o que permite a sua locomoção (Wagner e Roth, 2000; Cicchetti, Allen *et al.*, 2002).

### **Mecanismos gerais da migração transendotelial dos neutrófilos**

Leucócitos circulantes podem migrar dos vasos sanguíneos para os tecidos em ambas as condições de normalidade ou patológicas. Está bem aceito que a migração leucocitária através dos vasos ocorre por um processo orquestrado pela ativação de proteínas de adesão e seus ligantes, tanto nos leucócitos quanto nas células endoteliais, ECs (Lawrence e Springer 1991; Von Andrian *et al.*, 1991) Monócitos, linfócitos e PMNs, todos migram em função de um mecanismo semelhante mas, diferem nas suas respostas à quimiotáticos e sinais inflamatórios, particularmente em função da expressão quantitativa e qualitativa de suas moléculas de adesão (Dransfield, 1992; Springer, 1994; Li *et al.*, 2004). O início da migração começa com a captura dos neutrófilos da corrente sanguínea, pela parede dos vasos, seguido pela rolagem. Esse processo de marginação representa o comportamento normal dos neutrófilos circulantes. Apenas após um estímulo apropriado estar presente, após a rolagem, os neutrófilos tornam-se firmemente aderidos às paredes vasculares, sendo então posicionados para a migração, dos vasos sanguíneos para o parênquima tecidual.

#### **A. Contato inicial e Rolagem**

Ambos, a captura ou contato inicial, e a remoção dos PMNs da corrente sanguínea e sua rolagem pelo endotélio, são devidos à reversível união de glicoproteínas transmembrana de adesão chamadas selectinas, encontradas nos PMNs e ECs (Albelda *et al.*, 1994; Luscinskas e Lawler 1994; Crockett-Torabi e Fantone, 1995; Tedder *et al.*, 1995). Selectinas possuem um domínio lectina, cálcio dependente no terminal extra celular NH<sub>2</sub>, que é ligado a um domínio “growth factor-like” e então a um número de sequencias curtas de consensos. Um curto domínio intracelular é ligado à proteínas sinalizadoras de transdução (Crockett-Torabi e Fantone, 1995; Crockett-Torabi, 1998). Proteínas de adesão tipo selectinas, são

encontradas na maioria das células de origem hematopoiética e nas ECs de vasos sanguíneos e linfáticos.

### 1. Selectinas leucocitárias

Análise por microscopia intra vital da circulação microvascular em tecidos normais, mostram uma evidencia visual do comportamento da adesão e rolagem pelo vaso. Em tecidos não inflamados, uma tênue associação dos PMNs dentro dos vasos pós capilares pode ser bloqueada com anticorpos que interferem na adesão da selectina leucocitária, L-selectina (Mel-14, LAM-1, CD-62L) nos neutrófilos circulantes (Spertini *et al.*, 1991; Von Andrian *et al.*, 1991). A expressão de L-selectina constitutiva é grande em PMNs, recém liberados da medula óssea, comparado com PMNs maduros circulantes (Matsuba *et al.*, 1997). A perda ou liberação de L-selectina da superfície dos PMNs, é devido em parte, à atividade de uma metaloprotease que resulta em um rápido acúmulo de L-selectina bioativa no sangue (Kishimoto *et al.*, 1995). Autoproteólise da L-selectina pode ocorrer após exposição a vários mediadores inflamatórios como LPS, TNF $\alpha$ , podendo ocorrer pelo processo normal, na interação com a parede dos vasos. Por exemplo, inibidores de protease significativamente reduzem a velocidade de rolagem e a clivagem de L-selectinas em PMNs *in vitro*, sugerindo que a L-selectina é rotineiramente liberada de PMNs circulantes, em condições normais ou não patológicas (Walchek *et al.*, 1996). Então, quanto mais tempo os neutrófilos permanecem na circulação, mais L-selectina é perdida devido às ligações transientes e clivagem. Como a substituição dessa L-selectina não tem sido demonstrada e, um baixo nível de expressão está associado à apoptose, provavelmente essa baixa expressão funcione como um sinal para a remoção dos neutrófilos da circulação (Matsuba *et al.*, 1997). Um alto nível de L-selectina plasmática pode ocorrer durante uma infecção e talvez possa inibir a rolagem de PMNs em sítios não inflamatórios. L-selectinas bioativas solúveis podem unir-se à ligantes endoteliais e bloquear suas interações com recém produzidas L-selectinas neutrofílicas (Schleiffenbaum, 1992; McGill *et al.*, 1996).

Apesar de não totalmente caracterizado, o ligante endotelial correspondente da L-selectina do neutrófilo, é um membro do grupo das sialomucinas oligossacarídicas, que apresenta afinidade por L-selectinas expressas por plaquetas, linfócitos e monócitos (Varki, 1997). Estudos *in vitro* demonstraram um ligante endotelial para a L-selectina dos PMNs, induzida por LPS ou citocina exposta à

monocamada endotelial (Spertini *et al.*,1991). Além do mais, a rolagem dos PMNs, dependente de L-selectina ocorre em tecidos não inflamados, o que sugere a existência de uma contraparte expressa no endotélio (Von Andrian *et al.*, 1991; Walchek *et al.*, 1996).

O ligante para L-selectina melhor caracterizado, é o CD-34, o qual, é encontrado nas ECs dos altos vasos e liga-se seletivamente às L-selectinas dos linfócitos (Tedder *et al.*,1995<sup>a</sup>; Ager, 1996). O CD-34 e outras moléculas relacionadas, são longas cadeias proteicas modificadas com ligações O (O-liked sugar) e grupos siálicos (sialyl), com uma variada afinidade a todas as selectinas em sistemas estacionários (nonflow) in vitro. O ligante endotelial é, provavelmente uma variante fucosilada do CD-34 (Tedder *et al.*,1995a; Krause *et al.*, 1996).

## 2. Selectinas plaquetárias

Selectinas plaquetárias (P-selectinas) e selectinas endoteliais (E-selectinas), podem facilitar a adesão PMN-EC. Essas selectinas são expressas somente quando um estímulo inflamatório apropriado está presente. P-selectina (GMP-140 proteína granular de membrana/CD-62P é estocada intracelularmente nos corpúsculos de Weibel-Palade das ECs e nos grânulos  $\alpha$  das plaquetas (Malik e Lo, 1996). Após poucos minutos da exposição das ECs aos mediadores do processo inflamatório, como produtos do complemento, radicais livres, ou citocinas, P-selectinas são mobilizadas para a superfície celular onde podem interagir com os PMNs (PSGL-1 P-selectina ligante de glicoproteína-1/CD-162). Monócitos e plaquetas também possuem PSGL-1 e podem ligar-se à P-selectina nas ECs ativadas. Da mesma forma que o CD-34, a proteína PSGL-1 é modificada com o ácido siálico ligado ao oxigênio e outros grupos glicídicos. Tal ligação consiste de um homodímero unido por ligação dissulfeto na superfície dos PMNs, sendo capaz de ligar-se à dois ligantes de P-selectinas simultaneamente (McEver e Cummings, 1997).

PSGL-1 é uniformemente distribuída em PMNs quiescentes e na fase de rolagem. A ligação da L-selectina ocorre primeiro, sendo mais rápido e com menor meia vida que a ligação da P-selectina (Ley *et al.*, 1996). A ligação da P-selectina é caracterizada por demoradas associações PMN-EC, frenagem e eventual contato dos PMNs com a superfície dos vasos (Alon *et al.*,1997 e Davenpeck *et al.*, 1997).

A interação da P-selectina com PSGL-1 é de meia vida curta e reversível se eventos adesivos adicionais são rapidamente exigidos (Lawrence e Springer, 1991;

Finger *et al.*,1996; Davenpeck *et al.*, 1997). Na presença de estímulo apropriado, a ligação da P-selectina é acompanhada pela rápida redistribuição de PSGL-1 aos uropódios em neutrófilos ativados, e talvez sinalizem a transição do processo de rolagem para a captura (Bruehl *et al.*, 1997).

### **3. Selectinas de células endoteliais**

Uma segunda selectina produzida no endotélio, E-selectina (ELAM-1, CD-62), não é estocada, mas requer transcrição genética para sua expressão. O pico de expressão e atividade em ECs *in vitro* é de 4-6h após exposição à citocinas inflamatórias (Klein *et al.*,1995; Scholz *et al.*, 1996). E-selectina pode suportar contato e a rolagem dos PMNs de maneira similar à P-selectina (Lawrence e Springer, 1994). Então, o seu papel na inflamação é manter a rolagem dos PMNs, após a diminuição da expressão da P-selectina (Malik e Lo 1996). Da mesma forma que a L e P-selectina, a E-selectina liga-se *in vitro* à uma variedade de ácidos siálicos e fucose das glicoproteínas, bem como às glicosaminoglicanas, como o sulfato de heparina. Entretanto, *in vivo* o ligante para E-selectina talvez seja uma mucina modificada com ligações N à açúcares, que tem sido caracterizada em células murinas, chamadas E-selectinas ligante-1 (Levinowitz *et al.*, 1993; Willmroth e Beaudet, 1999). Um outro ligante sialico para E-selectina em células T bovinas, têm sido descrito, sendo distinto da E-selectina ligante-1 (Walchek e Jutila, 1993). Análogos humanos para ligantes murinos e bovinos, não têm sido bem descritos.

### **B- Adesão firme**

Os sinais iniciadores para o próximo passo da TEM, ou seja a adesão firme, são aceitos como sendo eventos mediados por receptores em resposta à citocinas inflamatórias, ou um evento propagado por sinais provenientes de selectinas ativadas. Os domínios citoplasmáticos da ligação L-selectinas e PSGL-1 ativadas, são ligadas às vias de transdução de sinais que levam à ativação das integrinas nos PMNs (Crockett-Torabi e Fantone, 1995; McEver e Cummings, 1997; Williams e Solomkin, 1999). Desta maneira, as selectinas talvez atuem na promoção ordenada da transição dos processos de adesão, estimulando a expressão de integrinas, de maneira seqüencial, assegurando o sucesso da migração.



## Integrinas

Integrinas são um grupo de glicoproteínas transmembrana heterodiméricas, encontradas nos neutrófilos e outras células hematopoiéticas, cuja função é mediar as adesões célula-célula e célula-matriz extra celular (Hynes 1992; Luscinskas e Lawler, 1994). Todas as integrinas são formadas por uma subunidade  $\alpha$  e outra  $\beta$  que, juntas, formam um sítio de ligação extracelular. Cadeias citoplasmáticas das integrinas provêm sítios de fosforilação e ligações às proteínas citoesqueléticas envolvidas na transdução de sinais (Alpin *et al.*, 1998). Há oito diferentes subunidades  $\beta$  (1-8) que associam-se com uma das dezesseis subunidades  $\alpha$ , para formar, no mínimo vinte e três receptores conhecidos, em uma variedade de células como neutrófilos, linfócitos e plaquetas. Integrinas são capazes de mediar a ligação célula-célula e também estão envolvidas com as ligações das células com proteínas extracelulares como laminina, vitronectina, fibronectina e fibrinogênio. A ligação dos PMNs ao endotélio ativado é mediada, primeiramente por duas integrinas que consiste de duas subunidades  $\beta 2$  (CD-18). Estas são, antígeno de macrófago-1 (Mac-1;  $\alpha m$ ,  $\beta 2$ -CD-11b/CD-18) e antígeno de função associada ao linfócito LFA-1;  $\alpha L$ ,  $\beta 2$ ; CD-11a/CD-18. LFA-1 é a integrina dominante na migração linfocitária (Li *et al.*, 1994). Um baixo nível de LFA-1 basal, expresso nos PMNs é inalterado por ativadores ou estímulo. Entretanto, LFA-1 e uma terceira integrina CD-18, p150,95(CD-11c/CD-18; $\alpha \beta 2$ ), promove o tráfico de PMNs, sob certas condições. Um quarto membro da família das integrinas  $\beta 2$ ,  $\alpha d$ , tem sido descrito como um importante mediador da adesão eosinofílica. Essa integrina não foi ainda relatada em neutrófilos (Grayson *et al.*, 1998).

Mac-1 surge como a mais importante integrina em vários modelos de resposta inflamatória relacionada aos neutrófilos (Luscinskas e Lawler, 1994; Malik e Lo, 1996). Mac-1 preformadas, são encontradas em três compartimentos separados nos PMNs: vesículas secretórias, grânulos específicos e grânulos gelatinase (Sengelov, 1996; Borregaard e Cowland, 1997). Dessa maneira, Mac-1 pode ser mobilizada rapidamente para a superfície dos neutrófilos, após ativação com o peptídeo fMLP, bem como por estímulos fracos que mobilizam somente vesículas secretórias (Altieri e Edgington, 1988). Em PMNs humanos esses estímulos tardios incluem o LPS e TNF $\alpha$ , dentre outros. Estímulos inflamatórios podem promover a transcrição e translação de gens Mac-1, prolongando o envolvimento da integrina durante a inflamação.

Mesmo quando Mac-1 é incorporado na membrana plasmática de células ativadas, somente uma pequena percentagem (10%), é competente para a união do ligante (Diamond e Springer, 1993). Além do mais, um pequeno número de moléculas Mac-1, incapazes de unir-se à ligantes, estão constitutivamente presentes nos neutrófilos. Então, a aparência física das integrinas na membrana celular, não é necessariamente transcrita em uma alta expressão para uma competente união do ligante. O sítio de união química do ligante, no Mac de membrana, encontra-se em uma região extracelular da subunidade  $\alpha$  denominada domínio de inserção, inacessível a potenciais ligantes, a não ser que as integrinas estejam ativadas por sinais intra ou extra celulares (Stanley e Hogg, 1998). Próximo desse domínio há um motivo (metal divalente de ligação), chamado sítio de adesão íon-metal dependente ou MIDAS. Quando unido por íons divalentes como manganês, exceto cálcio, ou outro metal, esse domínio sofre uma alteração conformacional que expõe o epitopo para a união do ligante (Michishita *et al.*, 1993; Oxvig e Springer, 1998).

Outro importante domínio no terminal  $\text{NH}_2$  da subunidade  $\alpha$ , é uma série de sete sequências repetidas que formam um domínio  $\beta$  (propeller) e possui cálcio como um suposto sítio de ligação que modifica a afinidade da união aos ligantes (Springer, 1997; Oxvig e Springer, 1998). A ativação das integrinas envolvendo um domínio de inserção, também existe na subunidade  $\beta$ , sendo necessário para a união de alguns ligantes. Sítios na porção intracelular da subunidade CD-18 são indispensáveis para a internalização e diminuição da expressão da união Mac-1 (Rabb *et al.*, 1993).

### **1.1.3. Células e biomateriais**

A adesão de PMNs (polimorfonucleares neutrófilos) e outras células inflamatórias às superfícies implantares é conhecida. Apesar da presença de neutrófilos, infecções periprotéticas permanecem como problema e a resposta inflamatória local induzida pelo trauma cirúrgico talvez potencialize esta infecção. PMNs participam ativamente na resposta inflamatória. Circulam quiescentemente até sua exposição aos estímulos inflamatórios. Uma vez recrutados migram para as áreas de infecção destruindo os patógenos principalmente por fagocitose e produção de superóxido. O fato de biomateriais implantados provocarem uma resposta inflamatória, acompanhada do recrutamento de células fagocitárias, é conhecido. O exato impacto dos biomateriais nos neutrófilos entretanto, permanece

indefinido. Vários pesquisadores têm estudado as interações entre os neutrófilos e os biomateriais na esperança de uma melhor compreensão do fenômeno (De La Cruz *et al.*, 1998; Dawitt e Hallett, 2007).

A ativação do metabolismo do oxigênio, exocitose de grânulos e o aumento na produção de ânion superóxido, tem sido detectada em neutrófilos expostos a biomateriais (Fabian, 1992; Diamond, 1993). Tal interação talvez esteja ligada à depleção de recursos celulares e à incapacidade do neutrófilo em montar uma explosão (*burst*) respiratória em resposta a patógenos potenciais (Fabian, 1992).

Quando os neutrófilos espalham-se nas superfícies das células endoteliais, a transformação da forma esférica para a forma achatada é dramática. Como a geometria esférica é a menor área requerida para conter certo volume, o volume celular deve diminuir, ou a sua área de superfície deve aumentar durante essa transformação. De fato, é a área da superfície que aumenta durante o seu achatamento nas superfícies (Dawitt e Hallett, 2007).

Foram utilizadas células interagindo com duas diferentes superfícies de implantes de Ti: usinadas e SLA. Durante um tempo de contato de 72h com as superfícies, além de outras características diferenciais, as células (Osteoblast-like cells, MG-63) apresentaram visíveis alterações morfológicas, (Giovanna Orsini *et al.*, 2000). Figs. 2 e 3.

Na superfície usinada, (Fig. 2), cuja textura é muito semelhante à superfície lisa utilizada na nossa pesquisa, as células apresentaram uma configuração mais achatada. Na superfície rugosa, idêntica à utilizada nesse trabalho, (Fig. 3) as células exibiram morfologia com maior número de pseudópodes, estando aparentemente mais aderidas à superfície mais irregular, comparado à usinada.

O que se pode inferir dos trabalhos realizados com diversas células, como por exemplo, células tronco, fibroblastos, macrófagos, osteoblast-like cells, células sanguíneas e neutrófilos, em particular, em contato com diversos substratos, é que as mesmas apresentam uma forma esférica inicialmente e, logo após o contato com as superfícies, aderem e exibem uma morfologia achatada. Pseudópodes, uropódios, dobramentos e a presença de lamelas, bem como outras características morfológicas de ativação, são dependentes, provavelmente, dos substratos e/ou moléculas nele adsorvidas como fibrinogênio, IgG, albumina entre outras.

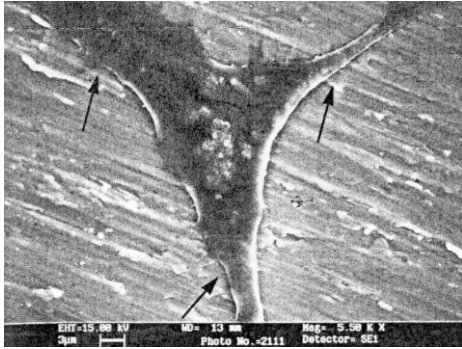


Fig. 2 - MEV - Superfície usinada 5.500x.



Fig. 3 - MEV - Superfície rugosa SLA 6.500x.

Osteblast-like cells 72h após interação com placas de Ti. A (Fig. 2 e 3) exibindo imagem de uma superfície de Ti semelhante à utilizada no nosso trabalho e uma célula mostrando uma configuração achatada, típica de células aderidas em superfícies lisas. A célula aderida à superfície rugosa SLA (idêntica à utilizada na nossa pesquisa), mostra alterações morfológicas distintas, com maior número de pseudópodes que lhe conferem um aspecto aparente de maior adesão ao substrato.

#### 1.1.4. Biomoléculas, moléculas de adesão e superfícies implantares

Fibrinogênio e imunoglobulinas são duas das proteínas dominantes nas superfícies implantares com as quais os neutrófilos interagem (Henson, 1971). Os PMN apresentam receptores para fibrinogênio e IgG, relacionados com quimiotaxia e fagocitose. Fibrinogênio liga-se aos receptores de integrinas dos neutrófilos Mac-1 (CD-11b/CD-18), (Henson *et al.*, 1992). Após sua ligação com fibrinogênio, interagem com iC3b e fator X. Mac-1 medeia importantes funções adesivo-dependentes como quimiotaxia e fagocitose. Iniciadas por sinais emanados do interior ou que penetram nas células, as ligações com receptores resultam em aumento na adesão celular e promovem transmigração para os tecidos adjacentes (Hynes, 1992). A IgG liga-se a dois receptores,  $Fc\gamma$ - RII (CD-32) e  $Fc\gamma$ - RIII (CD-16) expressos nos neutrófilos (Kaplan, 1990). Ligações  $Fc\gamma$ - R disparam várias funções efetoras das quais, a mais importante é a fagocitose.  $Fc\gamma$ - R é responsável pelo reconhecimento de partículas a serem ingeridas e aderência das mesmas à superfície celular para seu engolfamento e fagocitose. Entretanto, quando os neutrófilos encontram complexos imunes depositados nas superfícies sólidas, eles aderem a essas superfícies e liberam constituintes lisossomais fora da célula. A liberação de enzimas nestas condições é referida como fagocitose reversa ou frustrada (Kaplan, 1990). Ligações  $Fc\gamma$ - R nestas condições resultam em uma função neutrofílica aberrante.

A ativação do sistema complemento leva à ativação de produtos solúveis como C3a, C5a e C5b-9 e a ligação dos fragmentos C3 à superfície do material.

Conseqüentemente, neutrófilos e monócitos são ativados em função do aumento da integrina CD-11b/CD-18 (Mac-1). Vários autores têm mostrado a efetiva participação de diversos receptores e ligantes na adesão celular aos biomateriais (Jaan Hong *et al.*, 1999).

Receptores para proteínas plasmáticas foram bem descritas há algum tempo mas, pouco tem sido relatado sobre a caracterização de reações celulares às complexas misturas de ligantes presentes nos materiais em contato com o sangue. Os mecanismos que levam à inflamação, cicatrização ou rejeição são pouco conhecidos (Berton *et al.*, 1999).

Quando o implante é colocado em contato com o sangue, plaquetas chegam a sua superfície em dez segundos e, em cerca de dez minutos, expressam P-selectinas (CD-62P). A superfície do Ti portanto, não é inerte e talvez induza a produção de fatores quimiotáticos para neutrófilos. PMNs chegam a interface sangue/titânio em dez minutos e aderem em número que indica um ativo recrutamento dessas células (Cecília Eriksson *et al.*, 2001a).

Eriksson e cols. (2001a) estudaram os eventos iniciais após o contato entre o sangue e o implante *in vitro*, no qual o Ti foi exposto ao sangue total em coagulação. Foram utilizadas placas de Ti com superfície lisa, avaliando-se a expressão de receptores de adesão e “burst” respiratório. Os autores que os neutrófilos aderem ao Ti via receptores Fc $\gamma$ - RIII (CD-16), sofrendo uma primeira ativação. A subunidade ( $\alpha$ m) da L-selectina e receptores Fc $\gamma$ - RIII diminuíram uma hora após adesão. Nenhuma atividade de explosão respiratória nas células aderidas foi detectada, estando viáveis e respondendo ao uso de *zymosan* opzonizado durante as primeiras horas de contato com a superfície de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>).

Utilizando técnicas de fracionamento subcelular e microscopia imunoeletrônica, a localização das proteínas de adesão L-selectina e integrina Mac-1 ( $\alpha$ m $\beta$ <sub>2</sub> integrin), respectivamente na membrana celular e vesículas secretórias, foram determinadas (Kishimoto *et al.*, 1989).

Trabalhando com sangue total, em contato com placas de Ti, foi observado a expressão de CD-62L e CD-11b por granulócitos. Esse estudo mostrou uma alta expressão de L-selectinas nos tempos iniciais (8 e 10min.), decrescendo após 32 e 64 minutos quando, um aumento na expressão de CD-11b foi verificado (Cecilia Eriksson *et al.*, 2001a).

Constitutiva e uniformemente expressa por neutrófilos, a L-selectina é uma proteína transmembrana que exerce a importante função de proporcionar adesão fraca dessas células próximas aos sítios inflamatórios. O papel das L-selectinas na adesão é variado, facilitando o contato direto e indireto dos neutrófilos com as paredes vasculares. O amplo papel das L-selectinas, direcionando o acúmulo de neutrófilos, é estritamente regulado (Kishimoto *et al.*, 1989; Wagner JG *et al.*, 2000). Esta regulação inclui sua rápida e eficiente eliminação da superfície do neutrófilo sob ativação por vários estímulos, com virtualmente todas as moléculas de L-selectinas sendo liberadas por um processo proteolítico (Todd RF, 1996).

Sendo importantes receptores de adesão, as integrinas transmitem modificações conformacionais bidirecionalmente através da membrana. As subunidades alfa e beta formam a cabeça e duas longas caldas no ectodomínio expandem a membrana (Eriksson *et al.*, 2001b). Precedidos pela adesão, o espalhamento e a migração celular são eventos complexos que incluem a formação de protrusões na membrana, chamadas lamelas, na borda anterior da célula, e interações de adesão com o substrato. Além do mais, esses processos requerem uma polarização celular e uma coordenada dinâmica citoesquelética (Orsello *et al.*, 2001).

A compreensão dos mecanismos da migração transendotelial TEM (trans endothelial migration) de leucócitos para áreas de inflamação aumentou drasticamente na última década e novas moléculas de adesão têm sido identificadas. O papel fisiológico e patofisiológico desempenhado por essas moléculas tem sido descrito e o conhecimento das frações de moléculas de adesão torna-se importante na compreensão de formas específicas de inflamação. A complexa relação entre as moléculas de adesão, citocinas, e agentes quimiotáticos, tem grande interesse. Entretanto, ainda é pouco o conhecimento sobre os mecanismos de adesão, espalhamento e ativação de leucócitos em contato com diferentes superfícies de Ti.

#### **1.1.5. Espalhamento e migração celular**

Em diversos materiais recobertos com IgG e fibrinogênio, a morfologia de neutrófilos aderentes é diferencialmente afetada pela interação com a IgG ou com o fibrinogênio. Neutrófilos aderentes ao fibrinogênio mantêm sua forma esférica e arredondada com pouco espalhamento. Ao contrário, neutrófilos aderidos à IgG

encontram-se completamente espalhados, com suas superfícies exibindo pseudópodes polarizados (De La Cruz *et al.*, 1998).

A polarização celular é necessária para a motilidade do neutrófilo e pode ocorrer em um gradiente ou concentração uniforme de um quimiotático. Em ambos os casos, uma rápida montagem e desmontagem ocorre na parte anterior da célula, enquanto a actina cortical é orientada em direção à porção posterior do neutrófilo. Alguns tipos de proteínas que se ligam à actina, como na síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP), tem sido descritas localizar-se tanto na porção anterior quanto posterior da célula, durante a polarização e migração do neutrófilo (Myers *et al.*, 2005), enquanto outras proteínas que também se ligam à actina, como a Arp3, especificamente localizam-se nas áreas de protrusão dinâmica na parte anterior (Weiner *et al.*, 2007). A dinâmica da actina citoesquelética é estritamente controlada por proteínas reguladoras, incluindo atividade regulatória da polarização pelos membros da família das Rho GTPases como a Rac e Cdc42, ativas na porção anterior e Rho, atuando na porção posterior das células (Niggli, 2003).

#### **1.1.6. Superfícies implantares**

Os biomateriais, independente da sua utilização, podem ser divididos em quatro grupos: cerâmicas, metais e ligas metálicas, polímeros sintéticos e materiais naturais (Meyer *et al.*, 1991).

Com a consolidação do uso clínico dos implantes osteointegrados nas últimas décadas, a pesquisa no campo da implantodontia concentrou-se na melhora dos já expressivos índices de sucesso dos implantes. Estudos foram direcionados também, para a viabilização mais rápida dos implantes para uso clínico, na tentativa de reduzir o período de tempo necessário para a cicatrização óssea livre de carga funcional, recomendado no protocolo de pesquisa estabelecido pelo grupo de Gotemburgo (Adell *et al.*, 1981). Dentre as várias linhas de pesquisas visando tais objetivos, as características topográficas da superfície sintética oferecida à célula óssea na interface osso-implante foram consideradas relevantes pela influência na qualidade de osteointegração obtida (Kieswetter, 1996). Pesquisas com cultura de células *in vitro* em superfícies metálicas e cerâmicas apontam para resultados positivos no que diz respeito à adesão celular e resposta de deposição de matriz orgânica pelas células do fenótipo osteoblástico (colágeno tipo 1 e 2), resultando em expressivas diferenças percentuais no contato osso-implante entre superfícies

lisas e texturizadas (Kieswetter, 1996). Contudo, devido ao pouco tempo de observação clínica e ainda pela diferença nos processos de texturização, não se encontra consenso na comunidade científica quanto ao real benefício a médio e longo prazo, à sua importância para uso clínico. Questionamentos sobre o prejuízo no processo de osteointegração, com a possível liberação de íons metálicos e outros produtos decorrentes da corrosão e a conseqüente contaminação sistêmica de órgãos e tecidos são apontados como incógnitas potenciais, no ainda indefinido processo de texturização (Kummer, 1992).

O titânio é altamente resistente á corrosão em temperatura ambiente, devido à fina, protetiva e estável camada de  $TiO_2$  que se forma em sua superfície. Entretanto, íons de Ti, lentamente, podem difundir-se para os tecidos circundantes, podendo ser transportados para o soro e urina. (Rosengren, 1996). Apesar do Ti ser estável e biocompatível *in vivo*, foi medido um nível de Ti, acima de 21 ppm, em membranas fibrosas encapsulando implantes (Dorr *et al.*, 1990). A influência de íons metálicos liberados, na formação e mineralização óssea tem sido estudada *in vitro*. Íons metálicos, incluindo Ti, podem inibir a formação e crescimento de apatita, proliferação celular (Nusbacher *et al.*, 1978) e funções celulares específicas como atividade da fosfatase alcalina, ALP, (Leventhal, 1951), mineralização extra celular (Albrektsson, 1981; Thomas, 1985; Salzman, 1987) e expressão genética óssea (bone-release) (McNally, 1994). Alguns estudos *in vivo* (Ekdahl, 1993; Kim, 2006) mostram pigmentação em tecidos moles entorno de implantes de Ti. Entretanto, há pouco conhecimento dos efeitos do Ti na função celular, e na relevância entre os estudos *in vivo* e *in vitro*.

## **1.2. Microscopia eletrônica de varredura**

O desenvolvimento da aplicação do microscópio, principalmente para *specimens* biológicas, ocorreu em 1937, sendo Manfred von Ardenne, um dos pioneiros na microscopia de varredura (Manfred, 1937).





Fig. 4 - Microscópio eletrônico de varredura – Vista panorâmica



Fig. 5 - Microscópio eletrônico de varredura – Detalhes do aparelho

O advento do microscópio eletrônico de transmissão (MET) revolucionou a pesquisa científica, influenciando e alterando significativamente várias áreas, tanto em ciências biológicas como de materiais. Sua extraordinária vantagem residia no significativo ganho em termos de poder de resolução, em função do reduzido comprimento de onda ( $\lambda$ ), do feixe de elétrons, da ordem de centésimos de Å, contra 4000 a 7000Å da luz visível. Não se deve esquecer, contudo, que apesar disso, o MET apresenta sérias limitações como a impraticabilidade de examinar material biológico vivo, devido ao alto vácuo existente no interior do aparelho, e da necessidade da amostra ser muito delgada (usualmente, no máximo 2000Å). Assim, exceto quando se faz réplicas delgadas de superfície, o MET não é adequado para visualizar externamente as amostras.

Este problema foi solucionado com o advento do microscópio eletrônico de varredura

MEV - Field emission scanning microscopy: microscopia de varredura por emissão de campo. Embora concebido quando do desenvolvimento do MET, na década de 30, sua introdução comercial só ocorreu na década de 60, mas desde então tem sofrido contínuas melhorias, atingindo resoluções normais de 30-50Å, havendo modelos com sistema de iluminação especial que pode chegar a resoluções menores que 10Å. Sua aplicação é ilimitada quando se trata de examinar superfícies e, com acessórios especiais podem examinar secções espessas, bem como transformar se em um micro-analisador de raios-X, quando conjugado a detectores adequados.

No MEV, o elétron incidente, na maioria das vezes, interage com os átomos da superfície da amostra, de tal maneira que fica capturado nos orbitais inferiores do

átomo, deslocando outros elétrons, que são emitidos como elétrons secundários, dotados de energia significativamente mais baixa que os elétrons primários incidentes. No MEV são utilizados estes elétrons secundários.

### **1.3. Análise por dispersão de raio X**

É uma técnica analítica utilizada para análise elementar ou caracterização química de uma amostra. Sua principal característica é devida em grande parte, ao princípio fundamental de que cada elemento possui uma estrutura atômica única, permitindo que raio-X emitidos sejam característicos de um mesmo elemento químico. A emissão de raio-X ocorre quando elétrons primários chocam-se com elétrons dos átomos da amostra, deslocando-os. Quando a vacância ocupada anteriormente pelo elétron secundário, é preenchido por um elétron proveniente de um nível de maior energia, essa energia extra pode ser emitida sob forma de raio-X. Dessa maneira pode-se distinguir diferentes elementos químicos em uma determinada amostra.

Para estimular a emissão de raio-X característicos de uma amostra, um feixe de alta energia de partículas carregadas, elétrons ou prótons, ou ainda um feixe de raio-X, é direcionado para o espécime. No estado de repouso, um determinado átomo da amostra contém elétrons com discreto nível de energia, ligados ao núcleo. Um feixe incidente pode excitar um elétron de um nível mais interno, ejetando-o para um nível mais externo, criando uma vacância onde o elétron se encontrava. Um elétron de um nível mais externo, de maior energia, pode preencher esse espaço e a diferença de energia entre esses níveis é liberada sob forma de raio-X. A energia dos raio-X emitidos pela amostra pode ser medida pelo espectrômetro de dispersão de energia (Fig. 6). Como a energia dos raio-X é característica da diferença de energia entre os níveis, e da diferença entre a estrutura atômica do elemento do qual essa energia é emitida, a composição elementar da amostra pode ser medida.

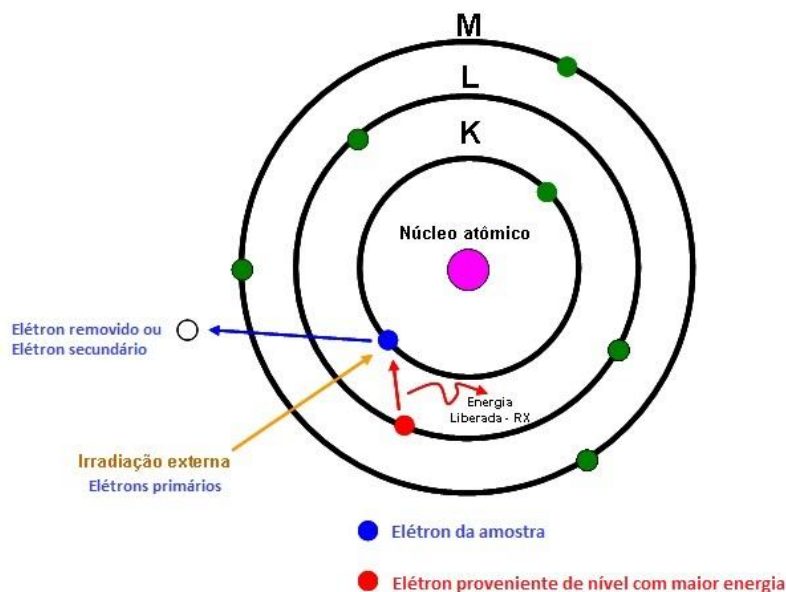


Fig. 6 - Esquema: Elétrons primários sendo removidos dos seus orbitais.

Quando a vacância, anteriormente ocupada pelo elétron primário, é preenchida pelo elétron secundário, de maior energia, essa energia “extra” pode ser emitida sob forma de raio-X.

#### 1.4. Microscopia de força atômica

O primeiro microscópio de força atômica, foi construído em 1986; logo após, surge o microscópio de varredura de tunelagem (Binning e Quate, 1986). A microscopia de força atômica é um tipo de microscopia de alta resolução na ordem de escala de frações nanométricas; sua capacidade é cerca de 1000 vezes superior em relação ao limite de um microscópio óptico (Binning e Quate, 1986).

Assim como qualquer equipamento, o MFA possui limitações. Para se determinar o uso deste equipamento é importante considerar suas vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens podemos citar: grande capacidade para registrar interações biomoleculares em ambientes líquidos, o que auxilia na análise de amostras biológicas (Hamon *et al.*, 2010). Diferentemente do microscópio de varredura, gera uma projeção ou uma imagem da amostra em formato tridimensional; não necessita tratamentos especiais que possam alterar ou danificar a amostra irreversivelmente; não precisa de um vácuo extensivo no meio (trabalha perfeitamente no ar ou ambiente líquido (Sitterberg *et al.*, 2010). Dentre as desvantagens destacam-se: digitalização de um único tamanho de imagem em comparação ao MEV; a velocidade de scaneamento também é reduzida, embora a qualidade da imagem seja superior; imagens de MFA também podem ser afetadas por histerese do material piezoelétrico, possibilitando a presença de artefatos.

Geralmente, não consegue medir paredes muito íngremes ou saliências, devido à natureza das sondas (Lapshin, 2004).

Basicamente, os princípios de funcionamento da MFA são bastante simples. Uma ponta atômica afiada é varrida sobre uma superfície com mecanismos de “feedback” que permitem que os scanners piezo-elétricos mantenham a ponta sob uma força constante para obter informações de altura, ou no modo não contato, para a obtenção de informações sobre força ou resistência na superfície da amostra.

### 1.5. Ângulo de contato

O ângulo de contato ( $\theta$ ) é a medida quantitativa da molhabilidade de um sólido por um líquido. É definido geometricamente, como o ângulo formado por um líquido, quando o mesmo é colocado sobre uma superfície sólida, conforme pode ser visto no esquema abaixo. Para a definição desse ângulo são consideradas duas retas: uma que passa pela base da gota do líquido a ser avaliado, e outra que tangencia essa gota. A intersecção dessas retas determina o ângulo de contato.

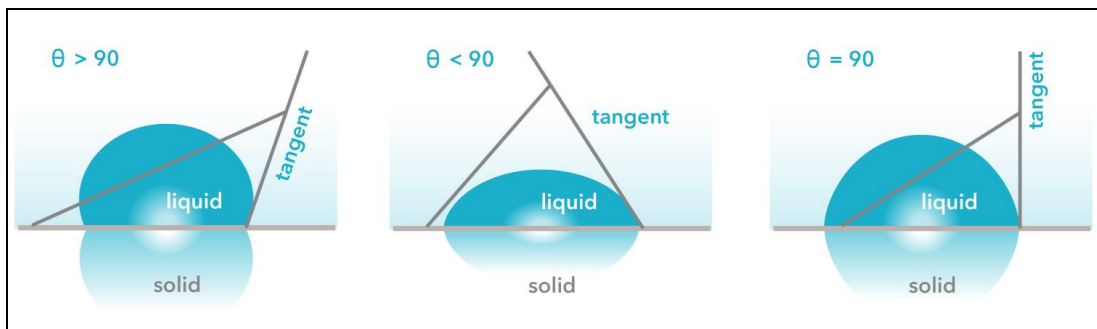


Fig. 7 - Esquema representativo de diferentes ângulos de contato.

O valor do ângulo ( $\theta$ ), é inversamente proporcional à molhabilidade entre um líquido e uma superfície sólida, ou seja, quanto maior o ângulo, menor a molhabilidade da superfície (BiolinScientific, 2009).

Na figura acima, pode-se observar que os baixos valores de teta indicam que o líquido espalha-se bem, ou seja, apresenta alta molhabilidade, os altos valores indicam baixo escoamento ou pouca molhabilidade. Se o ângulo de contato ( $\theta$ ) é menor que 90 graus, pode - se dizer que o líquido molha o sólido. Se esse ângulo é maior que 90 graus, pode-se dizer que o sólido apresenta pouca molhabilidade.

O ângulo de contato é o resultado de cargas elétricas, interagindo com o dipolo da água ou cargas, na célula.

## 1.6. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que mede e analisa simultaneamente diversas características físicas de partículas individuais, em geral células, à medida que o fluxo do fluido passa por um feixe de luz. As propriedades analisadas são o tamanho relativo, a granulosidade relativa ou a complexidade interna da partícula e a intensidade relativa da fluorescência. Essas características são determinadas por meio de um sistema de acoplamento óptico-eletrônico, que registra a forma como a célula ou partícula dispersa a luz do feixe incidente e emite fluorescência.



Fig. 8 - Citômetro de fluxo - Facs Calibur BD.

Um citômetro de fluxo (Facs) compõe-se de três sistemas principais: sistema de fluidos, óptico e eletrônico.

O sistema de fluidos transporta as partículas em um fluxo até serem interceptadas pelo feixe de laser.

O sistema óptico consiste em lasers que iluminam as partículas presentes no fluido da amostra e filtros ópticos que direcionam os sinais luminosos resultantes para os detectores apropriados.

O sistema eletrônico converte os sinais luminosos detectados, em sinais eletrônicos que podem ser processados pelo computador. No caso de alguns instrumentos equipados com o recurso de separação (*sorting*), o sistema eletrônico é capaz também de dar início às operações de carregar e desviar partículas. No citômetro de fluxo, as partículas são transportadas em fluxo de fluido até o ponto de interceptação. É possível analisar qualquer partícula ou célula com tamanho de 0,5 a 150  $\mu\text{m}$ .

Ao passar pelo ponto de interceptação do feixe de laser, as partículas dispersam a luz do laser, fazendo fluorescer moléculas excitáveis pelo comprimento de onda utilizado. Uma combinação de divisores de feixes e filtros direciona a luz dispersada e fluorescente para os detectores apropriados, que produzem sinais eletrônicos proporcionais aos sinais ópticos recebidos. Nesse momento, são coletados dados sobre cada partícula ou evento. As características ou parâmetros de cada evento baseiam-se na forma como a luz é dispersada e nas propriedades fluorescentes. Os dados são coletados e armazenadas no computador, analisados, provendo informações sobre as subpopulações da amostra. Como exemplo de dados, ao avaliarmos os neutrófilos, obtivemos uma análise quantitativa e qualitativa dos mesmos. O estado de ativação pode ser confirmado pela diferença de granulosidade e, a presença dos marcadores de adesão (CD-62L e CD-11b), demonstrado.

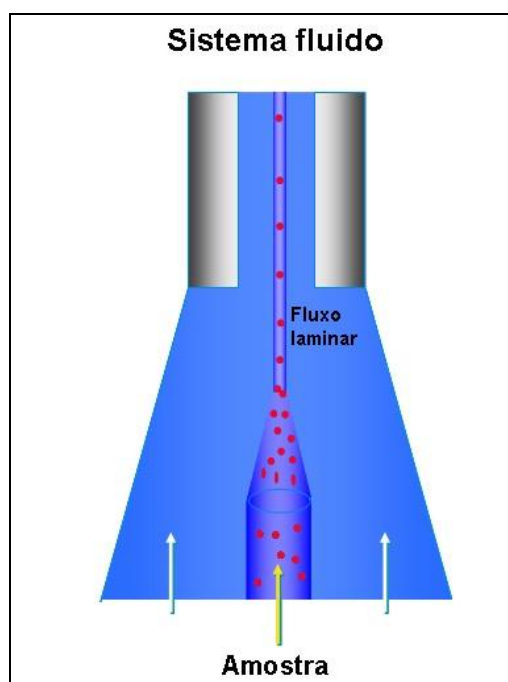


Fig. 9 - Esquema do sistema fluido encarregado de direcionar as células

As células ou partículas são conduzidas por um sistema hidrodinâmico, em direção ao feixe de raio laser. A seta localizada no centro da figura, representa as células a serem analisadas, perfiladas, e sendo conduzidas pelo sistema de fluxo laminar. Fonte: Patrícia Cisneiros dos Santos, UCSAL.

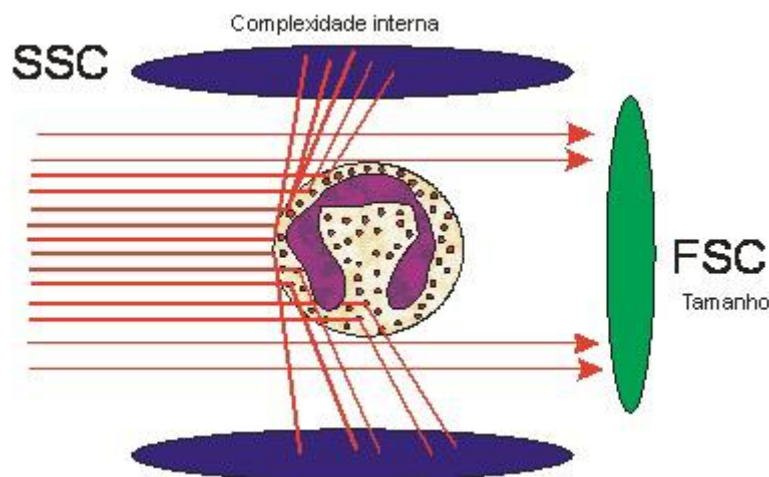


Fig. 10 – SSC mostra a complexidade interna e FSC o tamanho da célula

Avaliação das características físicas dos neutrófilos. Representação da incidência de luz no neutrófilo, desvio e detecção caracterizando granularidade (SSC) e tamanho celular (FSC) (modificada a partir de Darzynkiewicz, 2001)

## 1.7. Microscopia de fluorescência

Nos últimos vinte anos tem havido um grande crescimento no uso da fluorescência nas ciências biológicas.

A espectroscopia de fluorescência tem sido considerada uma importante ferramenta em bioquímica e biofísica, extensivo à outras áreas como biotecnologia, seqüenciamento de DNA forense, análise genética etc. A detecção do flúor é muito sensível, gerando imagens celulares e moleculares que revelam o local e as dimensões de moléculas intra-celulares.

Luminescência- é a emissão de luz por qualquer substancia e ocorre à partir de estados de excitação eletrônica, podendo ser dividida em duas categorias: fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado de excitação (Lakowicz, 2006).

## 1.8. Interação de células e biomateriais

A tendência das pesquisas indica que o sangue total, e também células específicas, tem sido alvo de estudos os que procuram elucidar o comportamento de diferentes células e sua interação com diversos biomateriais (Kummer, 1992; Nygren *et al.*, 1997; Ericsson *et al.*, 2001b).

Em um estudo realizado por Kumazawa, foi examinado o efeito do Ti e outros metais na função e morfologia de neutrófilos humanos, avaliando-se sua citotoxicidade e biocompatibilidade *in vivo* e *in vitro*. Foi comparado o efeito de

partículas de Ti menores (1-3 $\mu$ m) e maiores (10 $\mu$ m) que os neutrófilos e de íons dissolvidos, como íons de vanádio (V) e níquel (Ni), em relação á citotoxicidade. Em síntese, as conclusões do referido trabalho foram as seguintes:

- Os níveis de lactato de desidrogenase estiveram aumentados somente no grupo exposto a Ni. LDH é uma enzima intracelular envolvida na via glicolítica, tendo os seus níveis aumentados quando a membrana celular é destruída.
- Os níveis de anion superóxido produzidos pelos neutrófilos, aumentaram nas soluções contendo V e Ti. Estes íons são liberados quando as membranas dos neutrófilos são estimuladas.
- As partículas de menor tamanho utilizadas no experimento (1-3 $\mu$ m), promoveram aumento nos níveis de TNF $\alpha$ .
- As membranas celulares em contato com V e Ti mostraram-se expandidas em relação ao grupo controle (HBSS), apresentando uma morfologia mais complexa. Em contato com o Ni as células apresentaram suas membranas deformadas e destruídas (Kumazawa *et al.*, 2002).

Por ser o metal mais utilizado na implantodontia e objeto dessa pesquisa, apenas o Ti foi abordado no presente trabalho. Como os neutrófilos, rapidamente encontram as superfícies de Ti durante a colocação de um implante, precedendo a osteoindução e osteogênese, o objetivo desse trabalho foi caracterizar o comportamento dessa célula em diferentes tempos de interação. Procurou-se também elucidar se as diferentes topografias das superfícies de Ti influenciam as características da adesão, morfologia e expressão de receptores de adesão.

Estariam os neutrófilos sendo estimulados ou ativados de maneira distinta após a interação com diferentes superfícies? Ou ainda, há uma expressão diferenciada de moléculas de adesão como, L-selectinas e CD-11b, nos diferentes tempos da interação dos neutrófilos com as placas de Ti?



## 2. Justificativa

Embora haja indícios da melhor qualidade das superfícies de Ti tratadas, em relação às lisas, não está ainda claro, qual é o melhor tipo de topografia e a sua influencia na interação das células e o resultado, à longo prazo, no processo da osteointegração. A caracterização morfológica e funcional de pré osteoblastos, osteoblastos e osteócitos nas superfícies implantares tem sido estudada desde o início da implantodontia e cientificamente embasada. Entretanto, o estudo de células de defesa como o neutrófilo, que em poucos minutos, ao contrário das células ósseas, encontra a superfície de Ti, logo após sua colocação, tem sido objeto apenas de pesquisas mais recentes. Além do mais, há uma rica literatura utilizando o sangue total, e não apenas neutrófilos, separados e interagindo diretamente com as superfícies, por diferentes tempos. O presente trabalho procurou relacionar e caracterizar morfofisiologicamente neutrófilos e superfícies de Ti, na tentativa de esclarecer pontos ainda obscuros, na busca por uma superfície topograficamente adequada. Estudos *in vitro* restringem o uso de animais e diminuem o tempo de pesquisa, favorecendo a relação custo/benefício para a pesquisa e a indústria.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo Geral**

Caracterização física, morfológica e bioquímica de neutrófilos após sua interação com duas diferentes superfícies de titânio, após diferentes tempos de interação, observando sua influência na resposta inflamatória.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Observar e descrever as alterações morfológicas dos neutrófilos em diferentes tempos de interação com superfícies de Ti, lisas e rugosas, com uso da MEV.
- Avaliar a topografia das superfícies com utilização da MEV e da MFA
- Avaliar a composição elementar das duas diferentes superfícies por análise de EDX.
- Analisar o ângulo de contato ou molhabilidade das duas superfícies
- Caracterizar bioquimicamente, pela análise de marcadores moleculares de estímulo e ativação (anti CD-62L e anti CD-11b), a resposta dessas células após sua adesão ao Ti, comparando as superfícies utilizadas.
- Desenvolver um método que permita comparar a força de adesão de neutrófilos às diferentes superfícies.
- Avaliar a resposta de marcadores de adesão às diferentes superfícies testadas.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Delineamento experimental

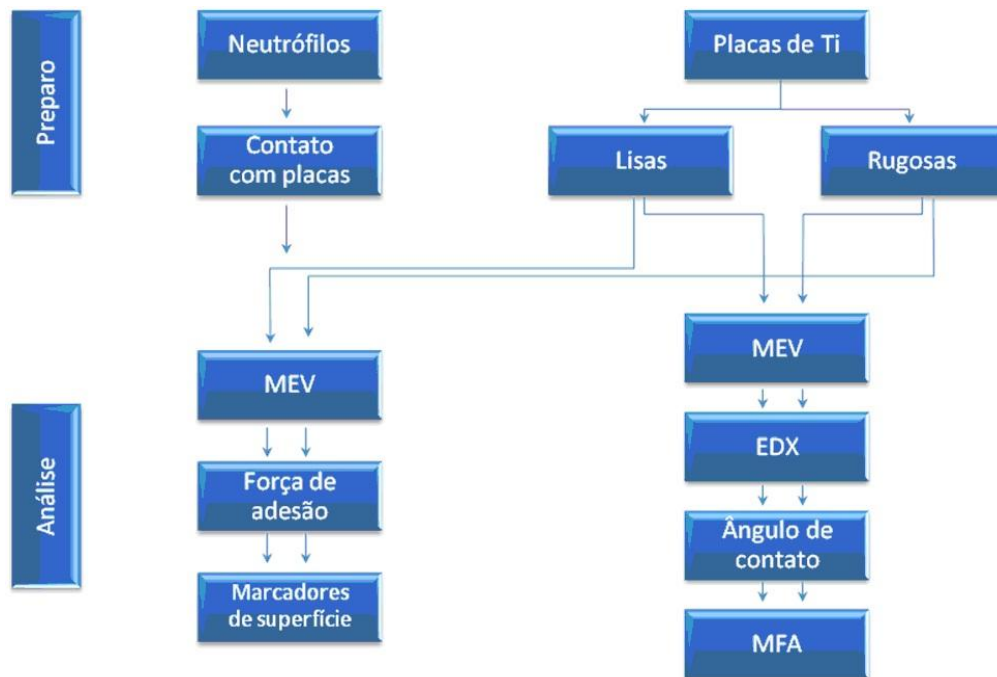


Fig. 11 - Delineamento experimental.

Após a coleta e separação dos neutrófilos, os mesmos foram colocados em contato com as placas pelos tempos definidos no experimento. Após esse período de contato as células foram avaliadas quanto à sua morfologia, por microscopia de varredura. As superfícies das placas também foram submetidas à MEV e à MFA, para avaliação das suas características topográficas, e EDX, para avaliar-se a sua composição elementar. O ângulo de contato das placas de Ti, foram medidos e, finalmente, após a remoção das células das superfícies pela técnica da força g, as mesmas foram colocadas em contato com os marcadores de adesão e submetidas à citometria de fluxo e microscopia de fluorescência.

### 4.2. Separação dos neutrófilos em gradiente de percoll

Sangue venoso periférico fresco foi obtido com uso de seringa tipo luer de 10 ou 20 mL. O sangue foi coletado, após consentimento informado, de indivíduos saudáveis e não usuários de medicamento.

Foi preparado um gradiente de percoll (Amersham Biociences, Uppsala, Suécia) com objetivo de purificar neutrófilos, por sua densidade, a partir de sangue venoso periférico heparinizado. O percoll é composto de partículas de sílica inertes, não tóxicas, que não aderem às membranas, sendo ideal para purificação de células e organelas. O gradiente foi composto por soluções a 60% e a 70% de percoll, diluído em solução balanceada de sais (HBSS). Tais soluções foram preparadas conforme a tabela 1.

Reagentes	60% (3 mL)	70% (3 mL)
Percoll 100% densidade: 1,130 g/mL	1800 $\mu$ L	2100 $\mu$ L
HBSS (solução balanceada de sais) 1 X	990 $\mu$ L	645 $\mu$ L
HBSS (solução balanceada de sais) 10 X	210 $\mu$ L	255 $\mu$ L

Tabela 1 - Gradientes de percoll.

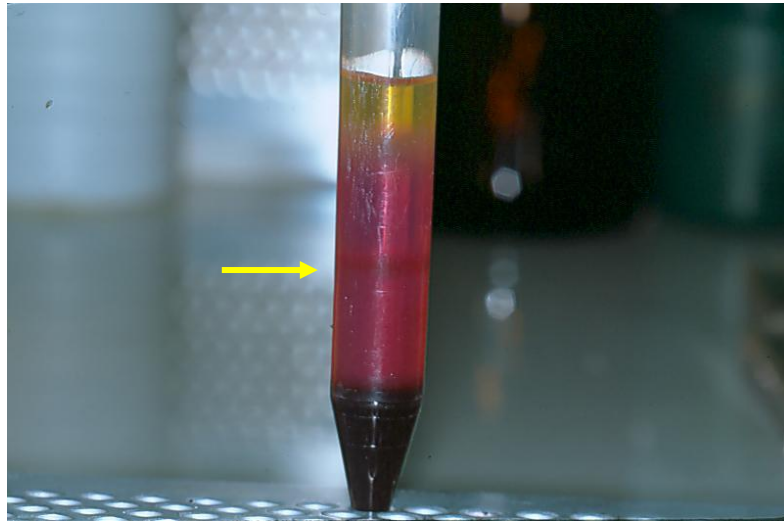
Durante a montagem de um gradiente, adicionou-se lentamente 3mL da solução de *percoll* 70% ao fundo de um tubo falcon de 15mL, que já continha 3mL da solução de 60%. Em seguida, 3mL de sangue heparinizado, coletado em material plástico, de forma a se evitar estimulação pelo vidro, foram colocados cuidadosamente por cima da montagem (Fig.12), e centrifugados a 400 g por 35 minutos a 22°C em centrífuga de caçamba móvel (himac CR 20B2) com aceleração/desaceleração de 2m/seg<sup>2</sup>.



Fig. 12 - Sangue/gradiente percoll.

Após a centrifugação, obteve-se um halo de neutrófilos situado entre os gradientes de 60% e 70% de *percoll*, que foi coletado e transferido para um novo tubo. As hemácias sedimentaram para o fundo do tubo e o plasma, juntamente com

as plaquetas e os demais leucócitos, permaneceram na porção superior do gradiente (Fig.13).



**Fig. 13 - Início da separação, após primeira centrifugação.**

Observar “halo”, onde há concentração de neutrófilos (Seta).

A fração do plasma foi desprezada e o halo de neutrófilos foi retirado diretamente com uma pipeta. As células recolhidas foram lavadas duas vezes com 10mL de HBSS para retirada de resquícios do percoll e as hemácias residuais foram lisadas com 3mL de água miliQ por 15 segundos. A osmolaridade foi restaurada após este tempo, pela adição de 9mL de NaCl a 1.2%. Ao final, obteve-se um “pellet” de neutrófilos (Fig.14), que foi ressuspensão em 500 $\mu$ L de PBS contendo cálcio e magnésio. Uma alíquota de 100 $\mu$ L (aprox.  $2 \cdot 10^5$  células) desta amostra foi separada para as análises de citometria de fluxo/câmara de Neubauer, avaliando-se o rendimento, a viabilidade e a pureza celulares.

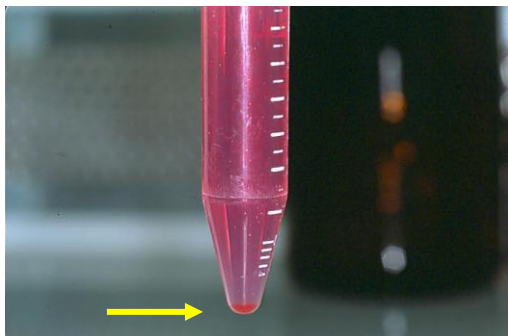


Fig. 14 - *Pellet* de neutrófilos ( $2 \times 10^7$  células) contendo hemácias residuais.

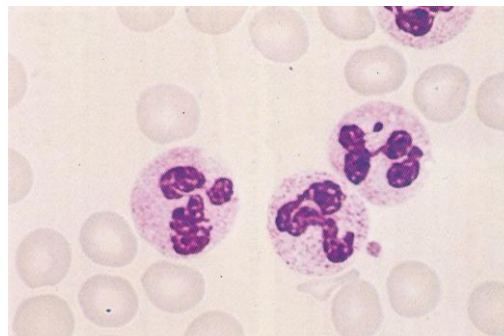


Fig. 15 - PMN separados, antes da hemólise.

#### 4.2.1. Análise celular: pureza, viabilidade e rendimento

A pureza foi verificada por contagem diferencial de leucócitos em lâmina corada com Wright e por citometria de fluxo através dos parâmetros intrínsecos: tamanho e granulosidade celular. Contou-se 100 células visualizadas no esfregaço e depois se verificou a porcentagem de neutrófilos. A contagem foi realizada em triplicata e uma média das três contagens foi considerada.

A viabilidade foi verificada pela citometria de fluxo, utilizando o iodeto de propídio e na câmara de Neubauer (Fig. 16) utilizou-se nigrosina 0,05%, como corante de exclusão. Foram pipetados 5mL da alíquota de suspensão de células para 20  $\mu\text{L}$  de solução de nigrosina 0,05% diluída em PBS, pH 7,2. Homogeneizou-se a suspensão, que foi adicionada a uma câmara de Neubauer até completo preenchimento de um campo de leitura. As células que apresentavam o interior corado de preto foram consideradas mortas e as não coradas foram consideradas vivas. Um total de 100 células foram contadas e a porcentagem de células vivas foi calculado. Esta análise foi realizada em triplicata e o resultado final foi uma média das três contagens.

O rendimento da separação foi determinado em hemocitômetro, diluindo-se 10  $\mu\text{L}$  da alíquota de células em 50  $\mu\text{L}$  do líquido de Turck. Esta suspensão foi homogeneizada e adicionada à câmara de Neubauer até o preenchimento do campo de leitura e o número de células presentes em cada região L do campo foi contado.

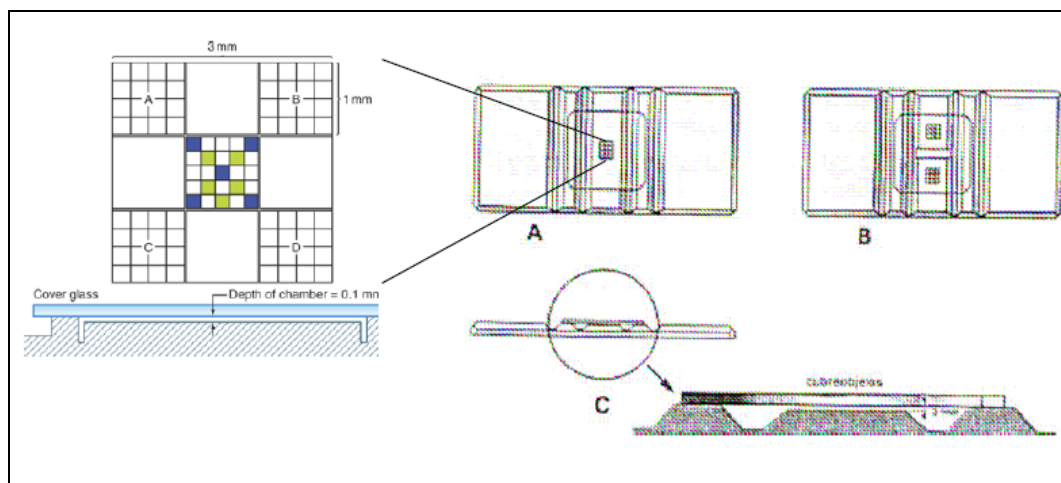


Fig. 16 - (A) Câmara de Neubauer.

Campo de leitura e (B) com dois campos de leitura, (C) mostra a profundidade da câmara de 0,1mm.

Após a otimização da técnica, foram necessários 12 mL de sangue de cada indivíduo, para se obter a quantidade de  $2 \times 10^7$  células.

### 4.3. Preparo das superfícies de Ti

Placas de Ti comercialmente puro (CpTi) ASTM, grau 4, confeccionadas e fornecidas pela Neodent (Neodent sistema de implantes, Curitiba, PR-Brasil), foram utilizadas. Uma das superfícies foi usinada e depois mecanicamente polida obtendo-se uma superfície lisa. A outra, após usinagem, recebeu um jato de areia com partículas grandes, seguido de duplo ataque ácido (HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) resultando em uma superfície rugosa (SLA). Ambos os discos apresentando espessura e diâmetro de um e seis milímetros respectivamente, foram embalados e esterilizados na indústria. Como relatado acima, as superfícies dos discos de Ti receberam dois diferentes tipos de tratamento (realizados pela empresa fornecedora das placas), resultando em uma superfície lisa e outra texturizada.

### 4.4. Análise das superfícies de Ti

#### 4.4.1. Microscopia eletrônica de varredura

A avaliação das características microtopográficas por MEV, das placas de Ti foi realizada no laboratório de microscopia eletrônica da UnB, e utilizou-se um equipamento JEOL JSM 840 A. Não houve nenhum preparo das placas, tendo sido as mesmas levadas diretamente ao equipamento, sem a utilização do processo de

metalização. A incidência do feixe eletrônico com as placas foi de zero grau, e a voltagem de aceleração foi de 15 KV.

#### **4.4.2. Análise por dispersão de raio-X**

A análise elementar e mapeamento foram realizados em um equipamento FEG, XL30 série Oxford, Philips (do departamento de engenharia de materiais - Dema- Universidade Federal de São Carlos, SP) e a composição de ambos os tipos de placas de Ti foram avaliadas. A concentração atômica relativa foi calculada a partir da altura relativa dos picos, após a correção por fatores tabulados de sensibilidade.

O MEV pode rapidamente ter a sua função alterada, substituindo-se a emissão do feixe de elétrons (raios catódicos) pela emissão de raios-X. Detectores especiais irão receber a energia resultante do deslocamento de elétrons primários de seus orbitais.

As amostras, constituídas apenas pelas placas estéreis, sem qualquer tratamento químico e sem células, foram colocadas no porta amostras, levadas para a câmara do aparelho tendo sua composições elementares avaliadas. Amostras a serem submetidas à microscopia eletrônica de varredura, via de regra, e na fase final da sua preparação recebem uma cobertura de pó de ouro (metalização), cuja finalidade é aumentar a condutância da amostra. Nesse experimento, devido ao fato das amostra serem metálicas, portanto, boas condutoras, não houve necessidade dessa etapa.

#### **4.4.3. Microscopia de força atômica**

As superfícies foram avaliadas por meio de microscopia de força atômica operada em modo contato, utilizando um equipamento SPM-9600 (Shimadzu, Japão) com um scanner apresentando dimensão de varredura máxima de  $125\mu \times 125\mu$ . As amostras foram colocadas nas moedas metálicas (porta-amostra), aderidas por meio de fita dupla-face. Ponteiros de nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) piramidais com uma constante de mola de aproximadamente 0,15 N/m foram utilizadas. A força aplicada e a velocidade de varredura nas amostras durante o procedimento foram determinadas de acordo com cada situação, mas nunca excedendo 20 nN. A resolução adotada foi de 512 x 512 linhas em uma área de varredura de  $50\mu \times 50\mu$ .



Repetidos procedimentos de varredura (incluindo traço-retraço e variações de ângulo) foram realizados na mesma região no intuito de confirmar que nenhuma alteração morfológica estivesse ocorrendo durante o procedimento de análise. As imagens foram processadas e as características nanoestruturais foram aferidas utilizando os softwares de aquisição e análise que acompanham os equipamentos, sendo realizada análise de superfície e determinação da média aritmética da rugosidade (Ra), altura máxima (Rz), rugosidade média dos 10 pontos representativos da amostra (Rzjis), raiz quadrática média da rugosidade (Rq), altura média (Rp) e profundidade média (Rv).

#### **4.4.4. Ângulo de contato**

Para a avaliação do ângulo de contato, foram utilizadas gotas de água destilada (20 $\mu$ L). Como o diâmetro das placas é de 6mm, o volume foi calculado para que a água ocupasse inteiramente a superfície da placa, sem entretanto, transbordar. Antes do descarte da água, a ponteira era aproximada, cerca de dois centímetros das placas. A mensuração dos ângulos de contato foi realizada pela técnica da projeção, que consiste em projetar em um anteparo, as curvaturas estabelecidas no contato líquido/superfície. A seguir utiliza-se um goniômetro medindo-se os ângulos. Tal procedimento, realizado em triplicata, mostrou diferentes angulações para as placas lisas e rugosas.

### **4.5. Exposição dos neutrófilos às superfícies de Ti**

Após a separação dos neutrófilos, como descrito anteriormente, os mesmos foram colocados em contato direto com as placas de Ti, lisas e rugosas (Fig. 17) por tempos de 5 min., 15 min., 30 min., 1,0 h e 2,0 h, utilizando-se uma ponteira carregada com 130  $\mu$ L de amostra contendo  $1.88 \times 10^3$  neutrófilos em suspensão. Para a obtenção da mesma quantidade de células a serem colocadas em contato com as placas, (cento e oitenta e oito mil), as células eram ressuspensas após a contagem e cálculo do rendimento. As células foram mantidas interagindo com as superfícies pelos tempos acima mencionados.



Fig. 17 - Placas de Ti lisas (A) e rugosas (B).

No fluxo laminar, os neutrófilos em suspensão eram colocados sobre as placas de Ti.

## 4.6. Análise das células

### 4.6.1. Microscopia eletrônica de varredura

Após a exposição dos neutrófilos às superfícies de Ti, as amostras foram cobertas com uma solução fixadora de Karnovsky (paraformaldeído a 2%, glutaraldeído a 2% e sacarose à 3%), seguido de tamponamento (solução de cacodilato de sódio 0,1 mol/L, pH 6,4 a 7,4). Esse é um método rotineiramente utilizado no preparo de amostras a serem analisadas pela MEV. A seguir, as amostras foram colocadas no porta amostras por meio de fita dupla face, colocadas em um suporte e submetidas à análise por MEV para avaliação das superfícies de Ti e das células nessas superfícies.

Foram utilizados dois instrumentos para análise por MEV (JEOL JSM 840A) do laboratório de microscopia eletrônica da UnB e JEOL JSM 6340F do instituto de química da Unicamp. Esta análise foi importante na obtenção de imagens, tanto da microtopografia das superfícies implantares, quanto da morfologia das células. Em síntese, a rotina de preparo das amostras para análise por MEV inicia com a fixação do material, ponto crítico (CPD), após a desidratação de rotina, culminando com a metalização das superfícies a serem avaliadas. A secagem ao ponto crítico é um procedimento realizado após a desidratação, e recomendado para amostras delicadas como células, por exemplo pois, elas sofreriam deformações durante a secagem ao ar. O ponto crítico de uma substância refere-se a certas condições de temperatura e pressão que a mesma deve ser submetida para que suas fases líquida e gasosa co-existam simultaneamente. Substancias como gás carbônico

(CO<sub>2</sub>) e certos fluorocarbonos têm seu ponto crítico próximos às condições normais de temperatura e pressão, comumente empregadas neste processo. No caso do CO<sub>2</sub>, por exemplo, seu ponto crítico é cerca de 31,1 °C a 73,8 bar. Em essência, a amostra depois de desidratada é colocada em uma câmara que pode ser herméticamente fechada, dotada de uma janela, com uma conexão fechada por válvula a uma bala de CO<sub>2</sub>, e outra para o exterior. A pressão na câmara é gradativamente aumentada até que se atinja o ponto crítico. Durante a desidratação e, especialmente na secagem ao ponto crítico, as amostras podem ser colocadas em gaiolas especiais para evitar sua perda.

Após exposição às superfícies de Ti, os neutrófilos foram fixados em glutaraldeído a 2%, tamponado em cacodilato de sódio a 0.1% (pH 7.4), pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%, desidratado em concentração crescente de etanol, secados (CPD) e montados em porta amostra de alumínio e jateados com ouro. As alterações morfológicas dos neutrófilos foram observadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM 6340F Hitachi Co. Tóquio, Japão). O microscópio foi operado em uma voltagem com aceleração de 3KV e aumentos variando entre 600 a 12.000x.

Um total de cento e doze células foram delineadas e a área das células aderidas a cada uma das superfícies foi calculada utilizando-se o software ImageJ 1.41 (National Institute of Health, USA).

#### **4.6.2. Remoção das células: força g**

O método denominado “força g”, desenvolvido no laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas LBQP, e utilizado nesta pesquisa, tem como finalidade medir a força necessária para deslocar ou retirar os neutrófilos aderidos às diferentes placas de Ti após os tempos estabelecidos no trabalho.

Após interação das células com as superfícies lisas e rugosas, as mesmas foram removidas das placas de Ti sob condições controladas de centrifugação, de forma a se manter constante a força g sobre a superfície. As células removidas foram contadas em câmara de Neubauer, e foram analisadas por citometria de fluxo quanto à presença de marcadores de membrana. A seguir descreveremos o equipamento, materiais e técnica de utilização do método “força g”.

Retira-se a tampa de um tubo eppendorf de 600µL e recorta-se o mesmo cerca de cinco milímetros do seu fundo. Coloca-se o disco de Ti no eppendorf na

região recortada com sua entrada voltada para baixo (Fig. 18) e com a superfície de interesse do disco voltada para o fundo cortado do eppendorf. Logo após, os neutrófilos, ressuspensos em 130  $\mu\text{L}$  de HBSS contendo Ca e Mg são pipetados e colocados sobre a placa, na superfície exposta pelo fundo do tubo (que teve sua extremidade removida), preenchendo o espaço compreendido entre a placa e o nível estabelecido pelo corte realizado na ponta do eppendorf (Fig. 18).

Todo o procedimento é realizado sob condições estéreis em fluxo laminar.



**Fig. 18 - Eppendorf com placa e células em suspensão, (130 $\mu\text{L}$ )**

Após o tempo de contato estabelecido no experimento, o conjunto eppendorf/placa é invertido num tubo tipo falcon de 15mL contendo mais 150 $\mu\text{L}$  de HBSS (Fig. 19).

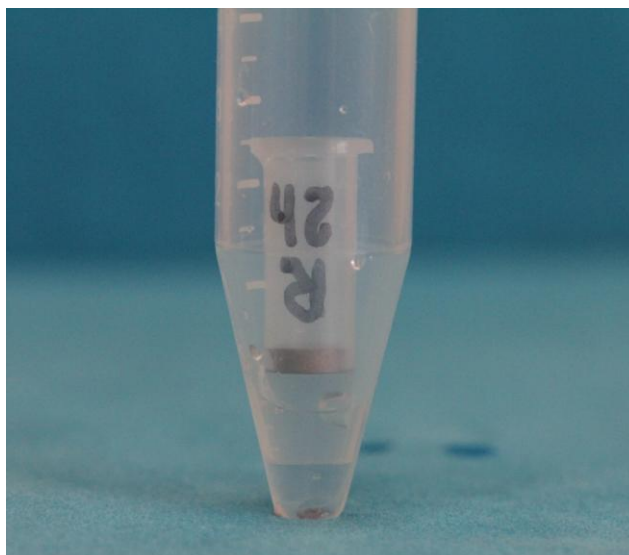


Fig. 19 - Eppendorf de 600µL invertido dentro do falcon de 15mL.

Essa montagem foi levada para uma centrífuga himac CR 20B2 (Hitachi, Tóquio, Japão) rotor tipo “swing” e submetida à centrifugação com os seguintes parâmetros: temperatura 22°C, rotação 1.300 rpm, altura da amostra de 2cm, resultando em uma força g igual a 290, durante 20 minutos, e ac/dc 2 m/s<sup>2</sup>. Com tal procedimento foi possível comparar o número de células que se desprenderam de cada superfície quando submetidas a uma força constante, bem como suas características morfo-funcionais. As células removidas foram coletadas, contadas em câmara de Neubauer e a comparação estatística entre as duas superfícies nos diversos tempos foi feita utilizando-se o teste t de Student. As células removidas foram também analisadas por citometria de fluxo para comparação do tamanho, granulosidade e expressão dos receptores de adesão CD-62L e CD-11b, como descrito a seguir. Foi possível obter-se, portanto, uma análise qualitativa indireta da força de adesão às diferentes superfícies.

Após a realização de diversos testes, modificando os valores da RPM, altura da amostra e tempo de centrifugação, a otimização do método nos permitiu concluir, estarem as células melhor aderidas às superfícies rugosas. Os resultados inicialmente utilizados e experimentalmente testados são mostrados na tabela que se segue. Tendo sido escolhidos os seguintes parâmetros: velocidade igual a 1.300 rpm, tempo de centrifugação 20 minutos e altura das amostras, 2cm. Assim, os “debris” resultantes da ruptura celular, em função de uma alta rotação e/ou tempo prolongado, ou mesmo altura das amostras, puderam ser evitados, e células morfológicamente normais eram removidas das placas pelo método descrito. Por

outro lado, baixas rotações, durante um curto período de tempo, mostraram-se insuficientes na remoção das células.

Velocidade em RPM	Tempo	Temperatura	Altura da amostra	Aceleração Desaceleração
1840	30 min	22 (°c)	4,0 cm	5 m/s <sup>2</sup>
1500	25 min	22 (°c)	4,0 cm	5 m/s <sup>2</sup>
1300*	20* min	22 (°c)	2,0* cm	2 m/s <sup>2</sup> *
1000	15 min	22 (°c)	2,0 cm	2 m/s <sup>2</sup>

Tabela 2 - Variação na RPM, tempo e altura das amostras

Parâmetros utilizados nos demais experimentos marcados com asterisco (\*).

#### 4.6.3. Receptores de adesão de membrana nas superfícies dos neutrófilos

Trabalhou-se nesse estudo com os marcadores de adesão CD-62L e CD-11b, pelo fato dos mesmos serem, respectivamente, relacionados com o processo de rolagem e adesão firme dos neutrófilos ao endotélio, fato já descrito na literatura (Ratner, 1993; Crocket-Torabi,1998).

As superfícies dos neutrófilos foram avaliadas em relação à quantidade de L-selectina (CD-62L) e integrina  $\alpha$ m, subunidade (CD-11b), após o contato dos neutrófilos com as superfícies de Ti, por diferentes períodos. Os neutrófilos ( $1.88 \times 10^5$  células) foram colocados em contato com as placas de Ti, da maneira já descrita, pelos períodos de 5 min,16 min,30 min 60 min e 120 min. Após cada um desses tempos, as células foram removidas por centrifugação (290g por 20 min.) e expostas a cada um dos conjugados (diluição final de 1:70 v/v para cada marcador) anti-CD-62L FITC e anti-CD-11b R-PE por cinco minutos, à temperatura de 25°C. A fluorescência foi detectada por citometria de fluxo (FACsCalibur, BD Becton Dickinson, Mountain View, Ca, USA), previamente calibrado com feixes fluorescentes disponíveis comercialmente, com uma coleta típica de 5.000 eventos por amostra. Um software (CellQuest TM), que controla a aquisição de dados foi também utilizado na análise. Neutrófilos isolados foram definidos por suas características morfométricas no forward-scatter (dispersão frontal - FSC) x side scatter (dispersão lateral - SSC) plots de densidade. Neutrófilos incubados em PMA (13-acetato de forbol éster 12-miristato), 100ng/mL por duas horas, foram utilizados como controle positivo. A análise estatística comparando as diferentes superfícies e os diferentes tempos foi realizada utilizando-se o teste ANOVA.

#### 4.6.4. Microscopia de fluorescência

As placas de Ti utilizadas no experimento foram colocadas em lâminas de vidro e, logo após a interação com os neutrófilos, durante os tempos de 5, 30, 60 e 120 minutos, foram analisadas por microscopia de fluorescência, em um microscópio Axiophot Carl Zeiss, Program Axio Vision.

Foram utilizados os marcadores: Dapi, Faloidina e anti CD-62L, com a finalidade de evidenciar, respectivamente, o núcleo, a actina do citoesqueleto e receptores de adesão de membrana. Número total de placas: 48, sendo 24 lisas e 24 rugosas. Nessa etapa do experimento, duas placas de Ti foram fixadas em cada lâmina de vidro, com a finalidade de reduzir espaço no fluxo laminar e permitir mais agilidade no momento da colocação simultânea dos diversos marcadores utilizados.

Finalmente as placas de vidro foram colocadas em placas de Petri, utilizando-se o protocolo de rotina para os marcadores, e em triplicata.

Como as placas de Ti são mais espessas que as lâminas de vidro, foram utilizadas brocas diamantadas esféricas nº1015 KG Sorensen, SP, Brasil, criando-se dois orifícios circulares em cada na lâmina, colocando-se as placas de Ti, as quais eram fixadas com resina fotopolimerizável, na região inferior do conjunto.

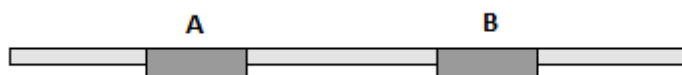


Fig. 20 – Esquema mostrando lâmina de vidro com placas de Ti (A e B)

Devido à coincidência no comprimento de onda na fluorescência da Faloidina e do CD-62L, esta fase do experimento foi realizada em duas etapas, sendo um conjunto de placas de Ti com as amostras marcado com Dapi e Faloidina e outro, com Dapi e CD-62-L.

<b>Placas Lisas (Total de 24 placas)</b>					
<b>Marcadores</b>	<b>Tempos de interação neutrófilos/placas de Ti</b>				<b>Triplicata</b>
Dapi + CD-62L	5min.	30min.	60min.	120min.	3x
Dapi + Faloidina	5min.	30min.	60min.	120min.	3x

Tabela 3 – Marcadores e tempo de interação dos neutrófilos - placas lisas

<b>Placas Rugosas (Total de 24 placas)</b>					
<b>Marcadores</b>	<b>Tempos de interação neutrófilos/placas de Ti</b>				<b>Triplicata</b>
Dapi + CD-62L	5min.	30min.	60min.	120min.	3x
Dapi + Faloidina	5min.	30min.	60min.	120min.	3x

Tabela 4 - Marcadores e tempo de interação dos neutrófilos - placas rugosas

## 5. Resultados

### 5.1. Microscopia eletrônica de varredura das superfícies de Ti

Superfícies lisas e rugosas exibem diferentes topografias quando examinadas por MEV, cuja análise revelou as seguintes características das superfícies estudadas:

As superfícies lisas apresentaram finas ranhuras decorrentes do processo de usinagem que antecede o polimento das mesmas, enquanto as superfícies rugosas apresentaram uma topografia mais texturizada, com profundas e estreitas indentações (Fig. 21 e 22). Estes resultados foram também confirmados por dados quantitativos da MFA (Figs. 28-31).

#### Placas lisas

O aumento de 160x mostra que, mesmo após o polimento, as superfícies polidas após a usinagem exibem ranhuras e pequenas irregularidades (Fig. 21).

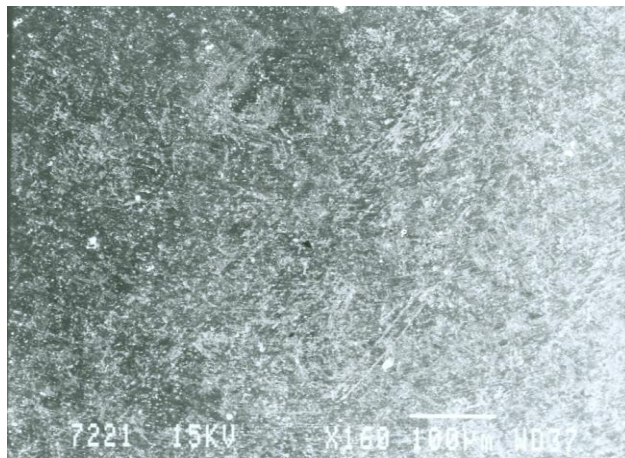


Fig. 21 - MEV Placa lisa, 160 x.

Com um aumento maior, as placas lisas mostram uma superfície que exhibe ranhuras mais evidentes do processo de usinagem, em aspecto de linhas concêntricas (Fig. 22).



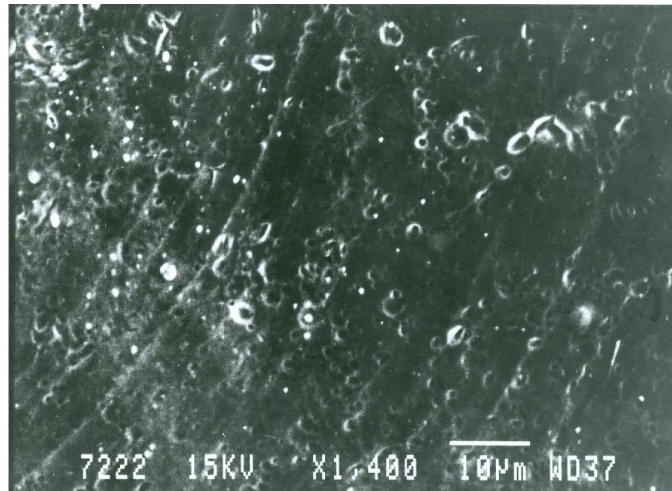


Fig. 22 - MEV Placa lisa, 1.400x.

### Placas rugosas

Em aumento de 160x, as placas rugosas exibem uma visível diferença na sua rugosidade superficial, comparadas às placas lisas. Estas placas receberam o tratamento SLA, fazendo com que as mesmas adquirissem o aspecto rugoso (Fig. 23). Os tratamentos realizados nas superfícies das placas de Ti promovem uma texturização uniforme nas superfícies.



Fig. 23 – MEV Placa rugosa, 160x.

O aumento de 1400x mostra com mais evidência o resultado do efeito do jateamento com areia, seguido de ataque ácido, nessas superfícies (Fig. 24). É com essas distintas superfícies, cujas diferenças topográficas foram também confirmadas no trabalho, pela microscopia de força atômica, que posteriormente, os neutrófilos irão interagir e serão avaliados quanto à morfologia e expressão de receptores de adesão.

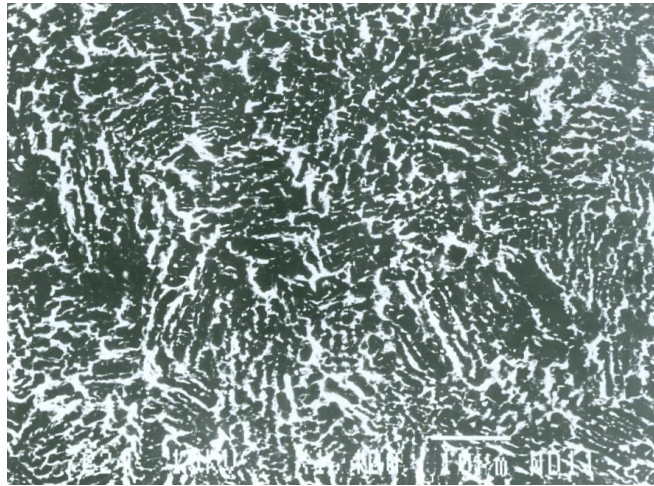


Fig. 24 - MEV Placa rugosa, 1.400x.

## 5.2. Análise elementar por dispersão por raios-X

Três placas lisas e três rugosas foram avaliadas nessa etapa do trabalho. Os resultados de cada conjunto, constituído por placas com superfícies com o mesmo tipo de tratamento, foram semelhantes. As figuras e gráficos abaixo, são representativos das médias das composições elementares das placas avaliadas. A análise por EDX mostrou apenas o elemento Ti como o componente mais abundante e o carbono como um contaminante minoritário nas superfícies lisas. As superfícies rugosas exibiram a mesma composição, exceto pela presença de diminuta quantidade de contaminantes como C, Si, Cl e Na; como mostrado nos Gráficos (25 e 26)

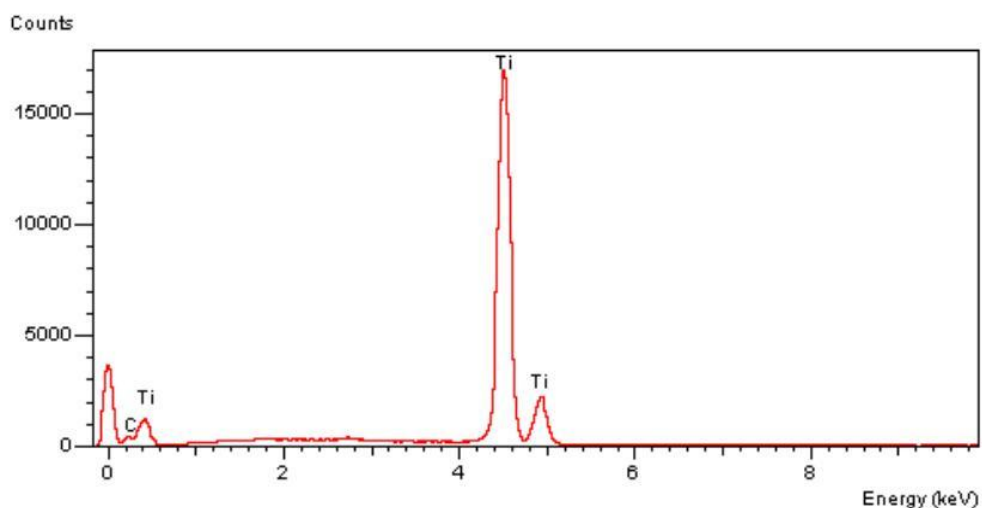


Fig. 25 - Gráfico EDX - Composição química elementar - placa lisa.

O gráfico acima exibe o elemento Ti em quantidade que demonstra a sua presença dominante na amostra, bem como, a inevitável presença de traços de C.

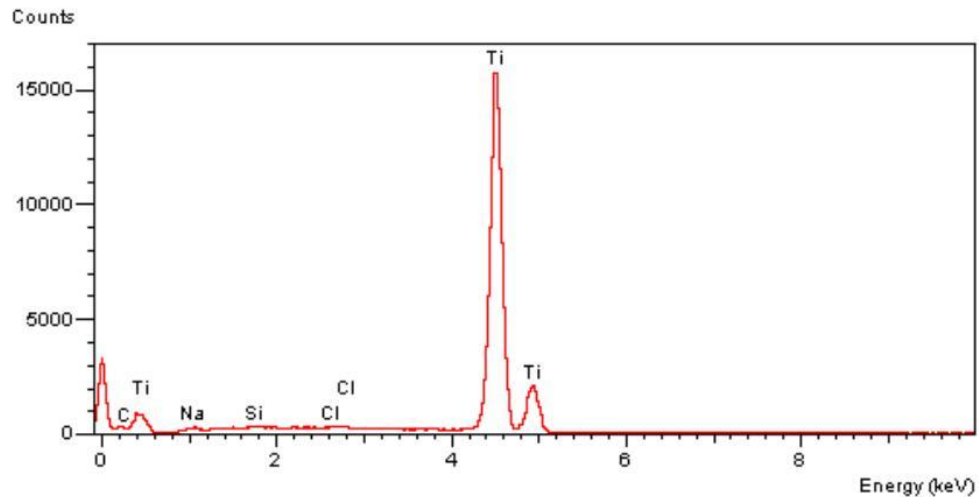


Fig. 26 - Gráfico EDX - Composição química elementar - placa rugosa.

O gráfico acima mostra, além do Ti, pequena quantidade dos elementos químicos, Cl, Na, Si e C.

### 5.3. Ângulo de contato

O ângulo de contato, hidrofiliçidade, ou espalhamento da água destilada em contato com a superfície lisa foi de 45,20 graus e de 30,10 graus nas placas com superfície rugosa (Fig. 27) Esse resultado está de acordo com trabalhos prévios encontrados na literatura. É conhecido que o espalhamento ou hidrofiliçidade encontra-se aumentado nas superfícies rugosas, com relação às lisas (BiolinScientific, 2009).

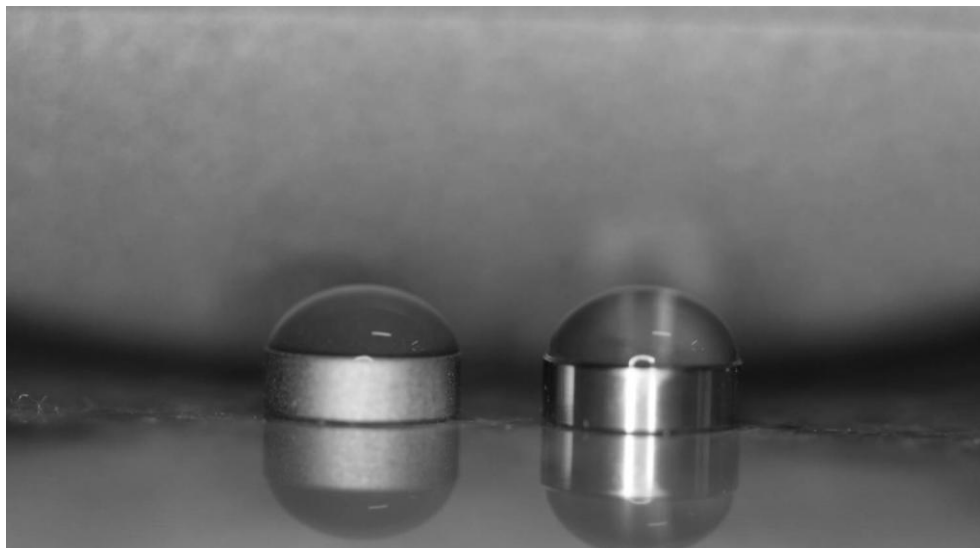
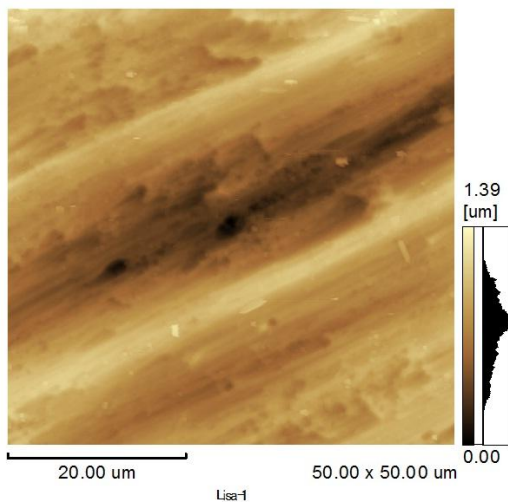


Fig. 27 - Ângulo de contato. Placa rugosa 30,10° e placa lisa 45,20°.

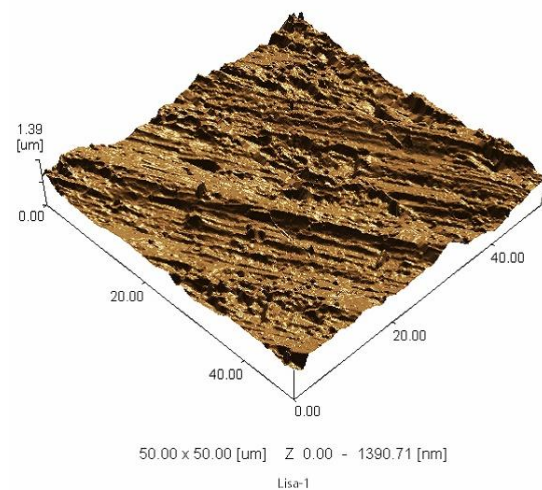
## 5.4. Microscopia de força atômica

A avaliação pela microscopia de força atômica mostrou diferenças topográficas entre as placas com superfície lisa e rugosa, conforme apresentado nas figuras que se seguem, nos vários parâmetros considerados, em especial, a altura máxima (Rz).

A média aritmética da rugosidade (Rzjis), avaliando-se dez pontos em cada amostra e a altura máxima (Rz), dentre outros parâmetros considerados na análise por MFA, mostrou que as placas lisas e rugosas apresentam grandes diferenças topográficas em suas superfícies. Resultado que corrobora os achados da MEV, (Figs. 28-32 e tabela 5).



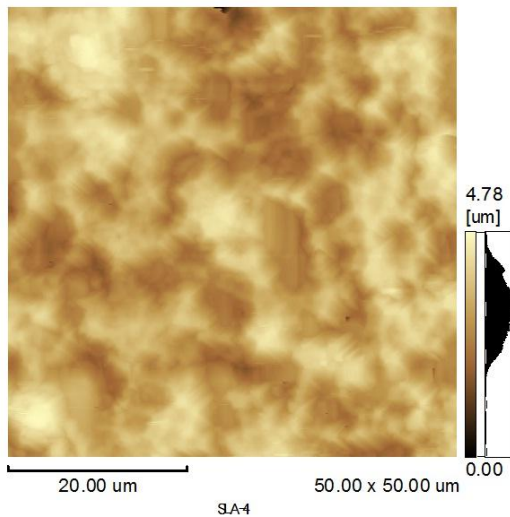
**Fig. 28 - Placa lisa 2D**



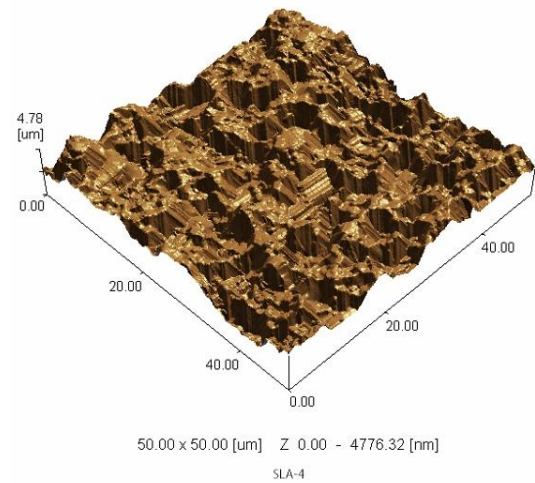
**Fig. 29 - Placa lisa 3D**

Imagens topográficas representativas obtidas por microscopia de força atômica a partir das duas superfícies sob investigação. Imagens processadas pelo software SPM-9600 off-line e mostradas em 2D e 3D.

Observar que a altura máxima (Rz), nas figuras 28 e 29, é de 1.39 $\mu$ m.



**Fig. 30 - Placa rugosa 2D**



**Fig. 31 - Placa rugosa 3D**

Imagens topográficas representativas obtidas por microscopia de força atômica a partir das duas superfícies sob investigação. Imagens processadas pelo software SPM-9600 off-line e mostradas em 2D e 3D.

Observar que nas figuras 30 e 31, a altura máxima ( $R_z$ ), é de 4.78  $\mu\text{m}$ .

	Ra (nm)	Rz (nm)	Rzjis (nm)	Rq (nm)	Rp (nm)	Rv (nm)
Média Lisa	129,0	1264,7	612,7	167,1	576,5	688,2
Média SLA	555,4	7945,7	3753,5	750,4	3839,0	4106,7

**Tabela 5 - Parâmetros de rugosidade calculados por MFA.**

Ver figura na seqüência. rugosidade ( $R_a$ ), altura máxima ( $R_z$ ), rugosidade média dos 10 pontos representativos da amostra ( $R_{zjis}$ ), raiz quadrática média da rugosidade ( $R_q$ ), altura média ( $R_p$ ) e profundidade média ( $R_v$ ).

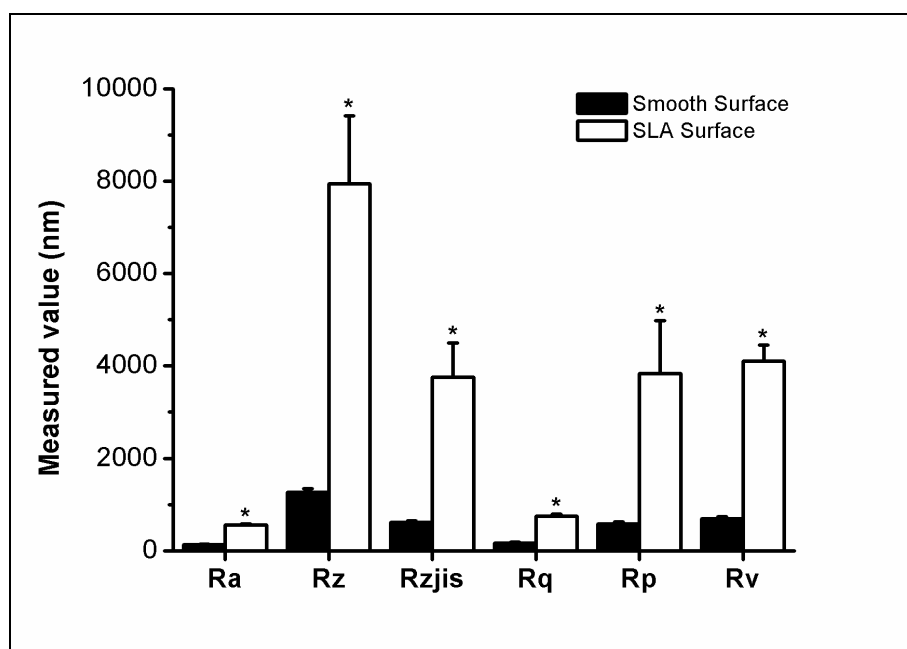


Fig. 32 – Gráfico das medidas de rugosidade obtidas por MFA

De acordo com os seis parâmetros analisados a partir de imagens obtidas em modo de operação contato e de aquisição topográfica. Parâmetros marcados com (\*) mostraram diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre a placa lisa e a placa rugosa.

## 5.5. Remoção das células

Os neutrófilos foram incubados por diferentes tempos (5min., 30min., 1h e 2h), nas duas superfícies. Após a colocação das células em contato com as duas superfícies pelos tempos referidos, as células foram removidas por centrifugação e analisadas por citometria de fluxo e por microscopia óptica. Iniciamos o processo de otimização da técnica de remoção das células das superfícies de Ti (força g), com o valor da RPM igual 1840, utilizando os parâmetros relacionados a esse valor (tabela 2). Observou-se, nesse caso, que somente células não viáveis e um grande número de “debris” celulares estavam presentes. Ao utilizarmos os parâmetros relacionados à RPM igual a 1500, “debris” celulares foram ainda observados (aproximadamente a metade da condição anterior) e poucas células viáveis foram encontradas. Diminuindo-se o valor da RPM para 1300, os “debris” celulares não mais apareceram e obtivemos um número expressivo de células. Ainda assim, testou-se uma RPM igual a 1000, juntamente com seus parâmetros, verificando que um número insignificante de células eram removidas, aproximadamente 5% da condição anterior, considerada na pesquisa. Os dados referentes à contagem de células recuperadas em cada tempo foram submetidos ao teste t de Student cujo resultado indicou que o número de células removidas das superfícies lisas foi

significativamente maior que nas rugosas nos tempos iniciais ( $P < 0.05$ ), como mostrado na figura (Fig. 33). Foi observado um significativo decréscimo ( $p < 0.05$ ) de células removidas comparando-se os tempos de 5 minutos ao de 30 minutos nas superfícies idênticas e uma adesão constante depois desse mesmo tempo (30 min.), em ambos os contatos.

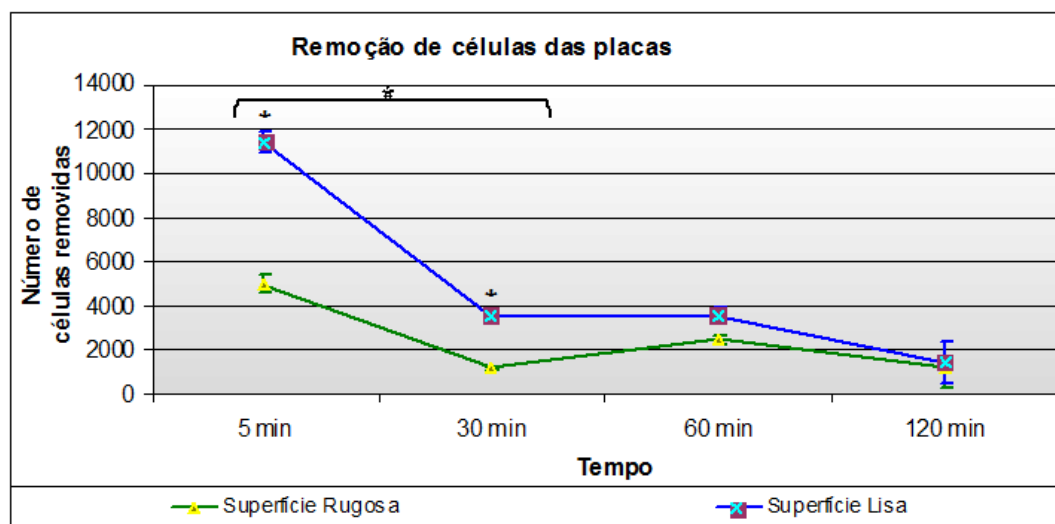


Fig. 33 - Número de células removidas das placas x tempo de incubação.

As células foram incubadas nos tempos entre cinco e cento e vinte minutos, nas diferentes superfícies e removidas por centrifugação. Os dados mostram significativa diferença (marcadas por \*;  $p < 0.05$ ) entre as placas lisas e rugosas aos cinco e aos trinta minutos. Houve ainda, significativo decréscimo no número de células removidas entre os cinco e os trinta minutos nas duas superfícies.

## 5.6. Receptores de adesão de membrana nas superfícies dos neutrófilos

Como os neutrófilos mostraram diferentes forças de adesão ao interagir com as superfícies de Ti lisas e rugosas, foram monitoradas a exposição de duas moléculas de adesão na superfície celular: CD-62L, um marcador da adesão fraca, normalmente presente em neutrófilos quiescentes, e removida após adesão ou ativação por PMA e CD-11b, um marcador da adesão firme, integrante do complexo Mac-1, normalmente exposto na superfície celular após ativação por PMA. Os dados foram obtidos por citometria de fluxo e submetidos ao teste ANOVA.

Os neutrófilos removidos das placas por centrifugação, incubados com marcadores de moléculas de adesão e submetidos à citometria de fluxo mostraram que a exposição dessas moléculas de adesão é desencadeada, de forma semelhante, independente da rugosidade da placa utilizada. A interação com as diferentes placas induziu expressão de CD-62L em um número maior de células

comparado ao controle positivo e menor que o controle negativo. (Fig. 34). O número de células apresentando CD-11b foi menor, comparado aos controles negativo e positivo em ambas as superfícies de Ti (Fig. 36). A média da intensidade de fluorescência (indicador indireto da quantidade de moléculas expostas) de CD-62L (Fig. 34) e CD-11b (Fig. 36), nas superfícies celulares, não foi significativamente diferente, comparando-se a interação com placas ao controle negativo, sendo porém observado maior quantidade de CD-62L e menor de CD-11b, comparando-se a interação com placas ao PMA.

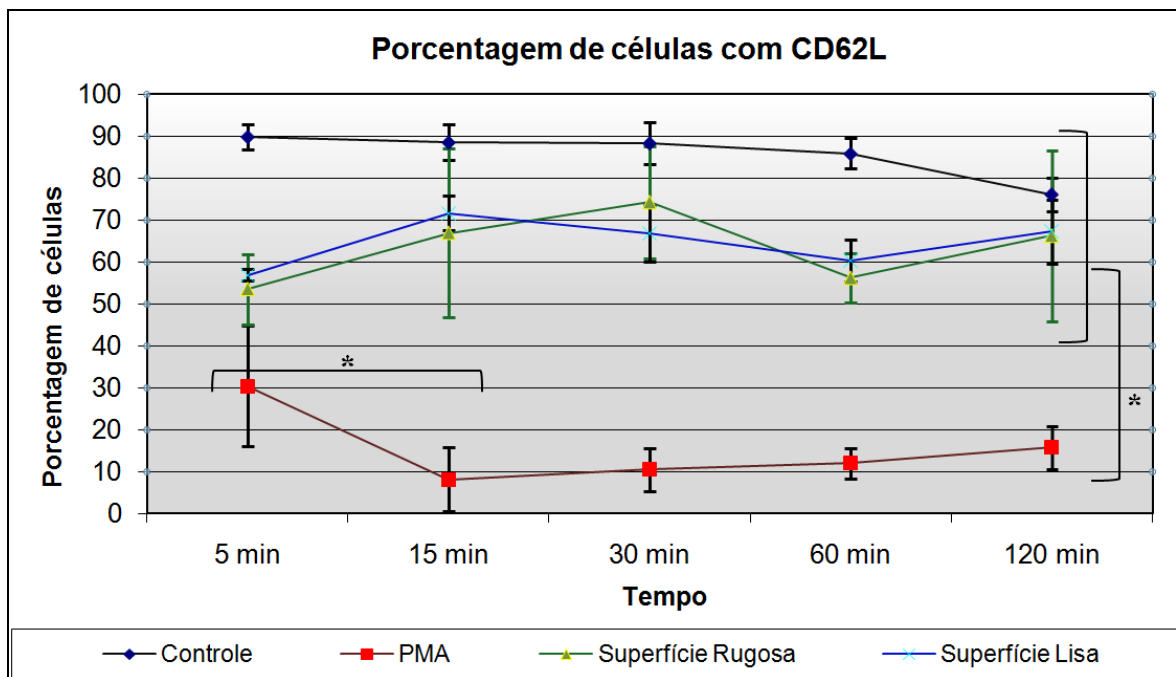
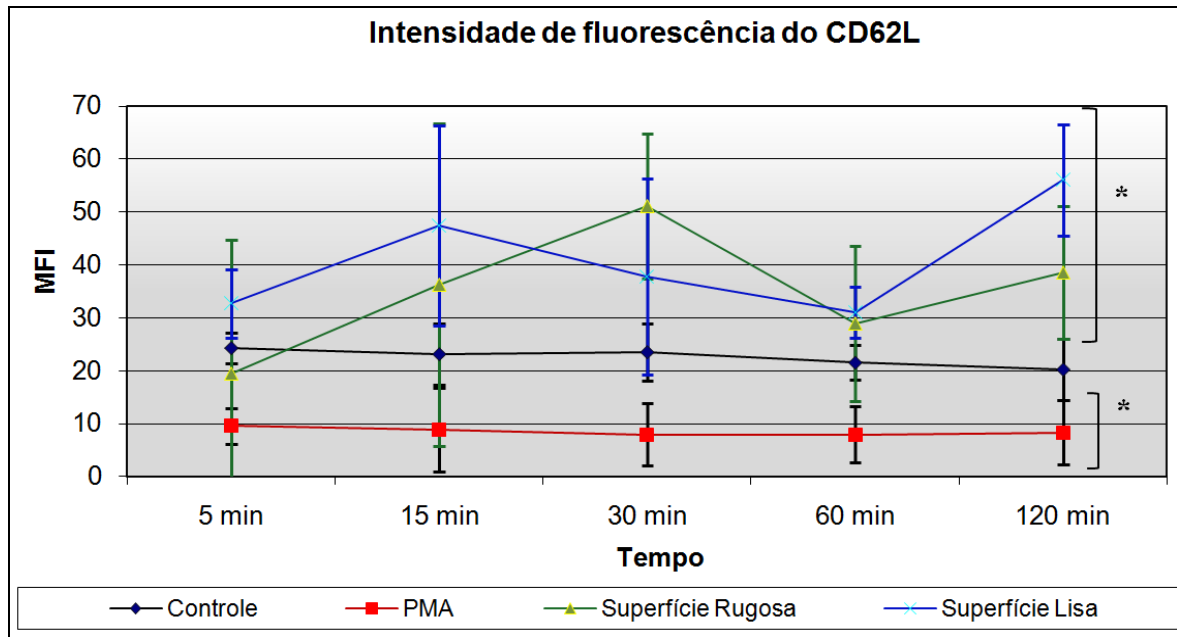


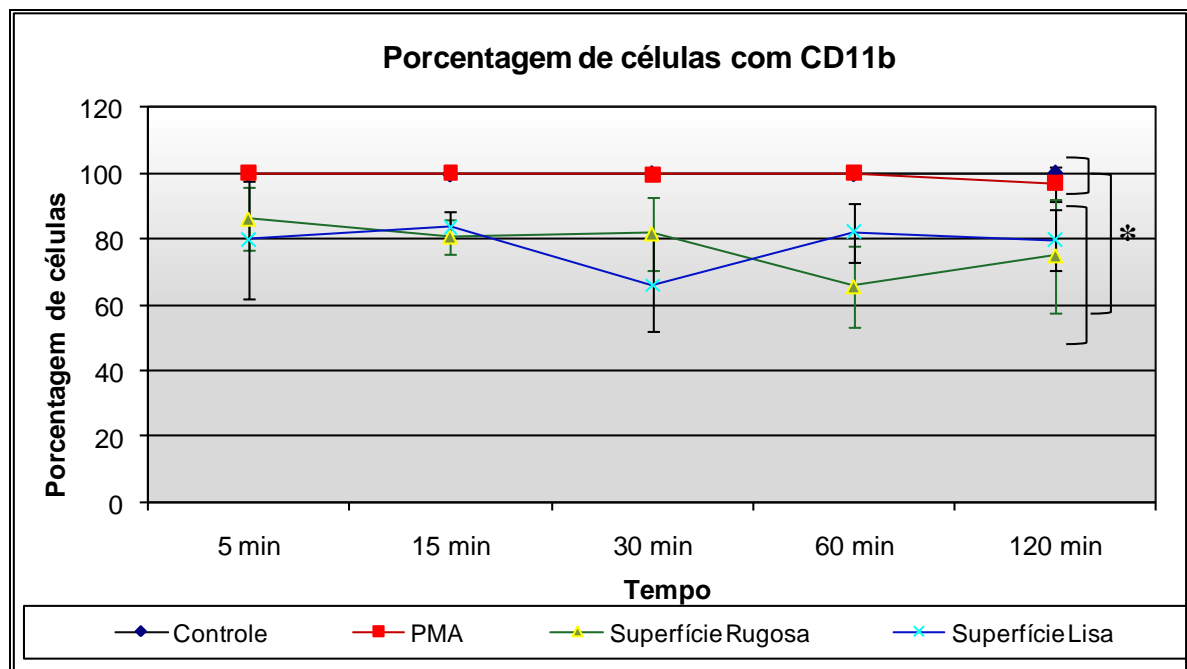
Fig. 34 - Porcentagem de células com CD-62L x tempo de incubação.





**Fig. 35 - Intensidade de CD-62L x tempo de incubação.**

Exposição de CD-62L em neutrófilos. Percentagem de células apresentando CD-62L (gráfico superior) e fluorescência média por células (gráfico inferior) após ativação com PMA, e contato com superfícies de Ti lisas e rugosas nos períodos entre cinco e trinta minutos. Anti CD-62L foi usado para detectar, por citometria de fluxo, a expressão de L-selectina na superfície celular. Não houve influência do tempo na percentagem de células ( $p=0,382$ ), e na intensidade de CD-62L ( $p=0,156$ ). Mas houve significativa diferença na percentagem de células ( $p=0,000$ ) nas seguintes condições: Controle versus PMA, superfícies lisas e rugosas; PMA versus superfície rugosa e lisa e na intensidade da fluorescência ( $p=0,001$ ) somente entre as condições PMA versus superfícies lisas e rugosas.



**Fig. 36 - Porcentagem de células com CD-11b x tempo de incubação.**

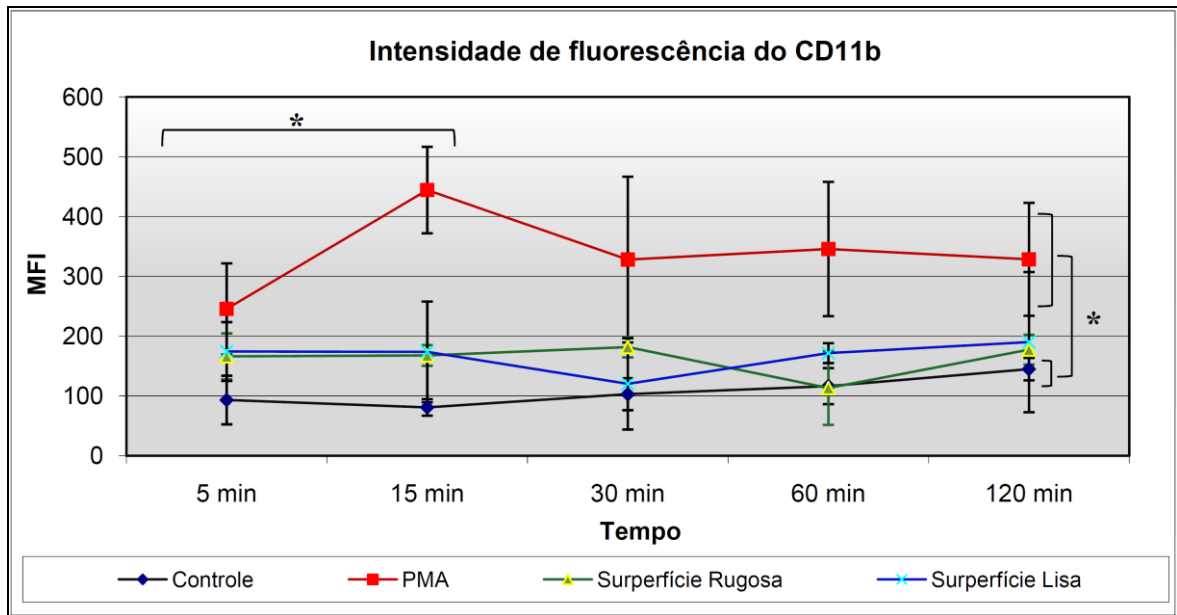
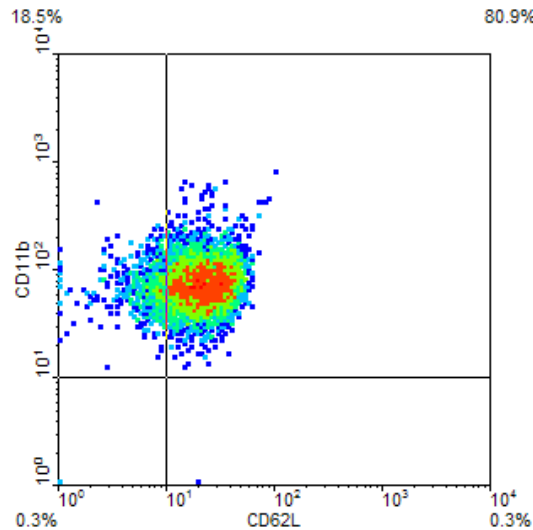


Fig. 37 - Intensidade de CD-11b x tempo de incubação.

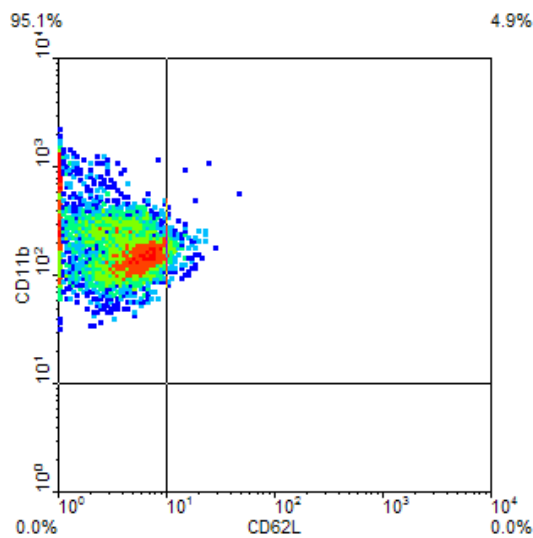
Percentagem de células apresentando CD-11b (linhas) e intensidade média de fluorescência por células (boxes) após ativação dos neutrófilos com PMA e interação com as superfícies de Ti, lisas e rugosas, por tempo compreendido entre cinco e cento e vinte minutos. Anti CD-11b foi usado para detectar a expressão da subunidade  $\alpha_m$  da integrina. Não houve influência do tempo na presença de CD-11b ( $F_{4,32}=0,866$ ;  $p=0,459$ ) ou na intensidade de fluorescência ( $F_{4,32}=1,376$ ;  $p=0,277$ ). Houve significativa diferença ( $F_{3,8}=30,803$ ;  $p=0,000$ ) entre as seguintes condições: Controle versus superfícies lisas e rugosas; PMA versus superfícies lisas e rugosas e na intensidade de fluorescência ( $F_{3,8}=15,813$ ;  $p=0,001$ ) entre as condições: PMA versus controle, lisas e rugosas.

Nas figuras seguintes (38 a 46), observa-se o resultado da análise da população de neutrófilos por citometria de fluxo. Pode-se observar o resultado da intensidade de fluorescência dos marcadores CD-62L (L-selectina) e CD-11b (integrina  $\alpha_m$ ) expostos na membrana citoplasmática. Foram consideradas as seguintes condições: neutrófilos interagindo com as duas diferentes superfícies, em diferentes tempos de interação. Utilizou-se ainda um controle negativo (n-normal), células em placas lisas, células em placas rugosas e células ativadas por PMA (controle positivo).



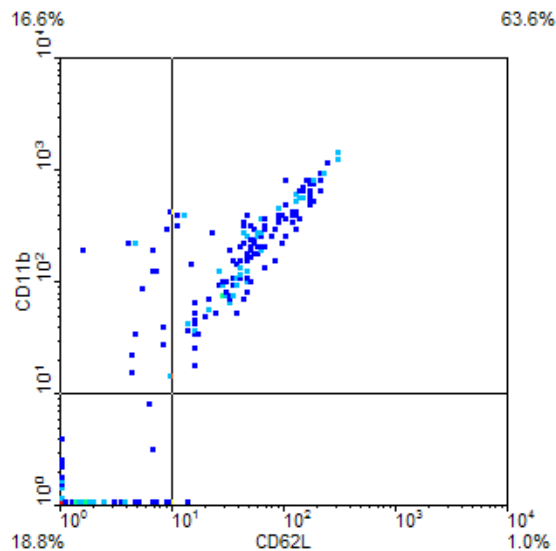
**Fig. 38 - FACs controle negativo - 30 min.**

Análise da população de neutrófilos por citometria de fluxo observando a intensidade de fluorescência dos marcadores CD-62L (L-selectina) e CD-11b (integrina  $\alpha$ m) expostos na membrana citoplasmática. Neutrófilos sem ativação (controle negativo), analisados após 30 minutos apresentando CD-62L e CD-11b em níveis basais.



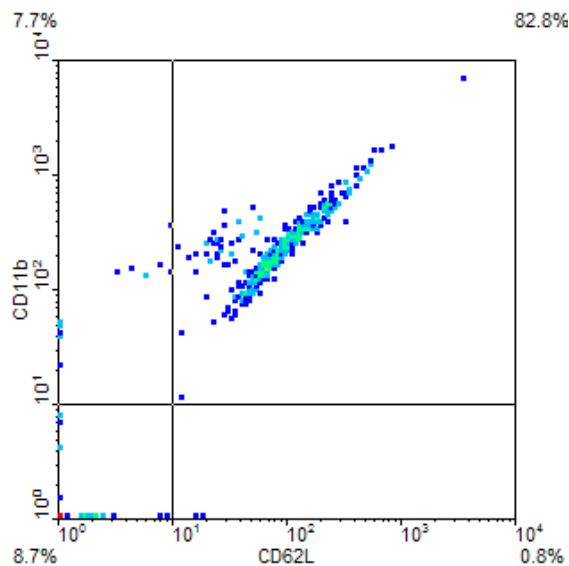
**Fig. 39 – FACs controle positivo- (PMA) 30 min.**

Análise da população de neutrófilos por citometria de fluxo observando a intensidade de fluorescência dos marcadores CD-62L (L-selectina) e CD-11b (integrina  $\alpha$ m) expostos na membrana citoplasmática. Neutrófilos expostos ao PMA (controle positivo) após 30 minutos apresentaram diminuição na intensidade de fluorescência de CD-62L e elevação na intensidade de fluorescência de CD-11b em comparação ao controle negativo.



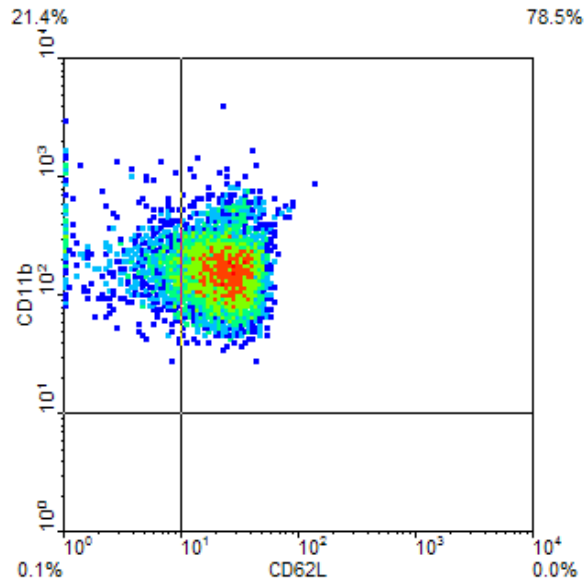
**Fig. 40 – FACs Placa lisa 30 min.**

Avaliação da população de neutrófilos por citometria de fluxo observando a intensidade de fluorescência dos marcadores CD-62L(L-selectina) e CD-11b (integrina  $\alpha$ m) expostos na membrana citoplasmática. Neutrófilos expostos a placas lisas após 30 minutos apresentaram uma pequena elevação na intensidade de CD-62L e CD-11b em comparação ao controle negativo, porém, não significativa. Já comparadas ao controle positivo (PMA), as placas lisas demonstraram intensidades aumentadas para CD-62L e diminuída para CD-11b, ambas significativas. Quando comparado a placa rugosa no mesmo tempo, o comportamento foi semelhante.



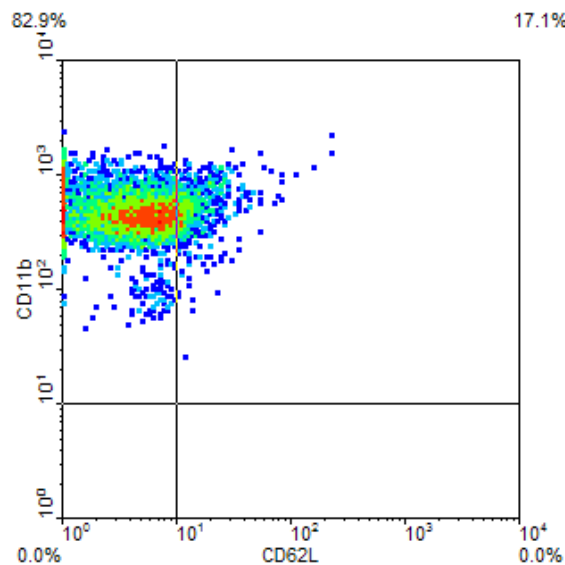
**Fig. 41 – FACs – Placa rugosa 30 min.**

Avaliação da população de neutrófilos por citometria de fluxo observando a intensidade de fluorescência dos marcadores CD-62L(L-selectina) e CD-11b (integrina  $\alpha$ m) expostos na membrana citoplasmática. Neutrófilos expostos a placas rugosas após 30 minutos apresentou uma pequena elevação na intensidade de CD-62L e CD-11b em comparação ao controle negativo, porém não significativa, já no controle positivo (PMA), as placas rugosas demonstraram intensidades aumentadas para CD-62L e diminuída para CD-11b, ambas significativas. Quando comparado a placa lisas no mesmo tempo o comportamento foi semelhante.



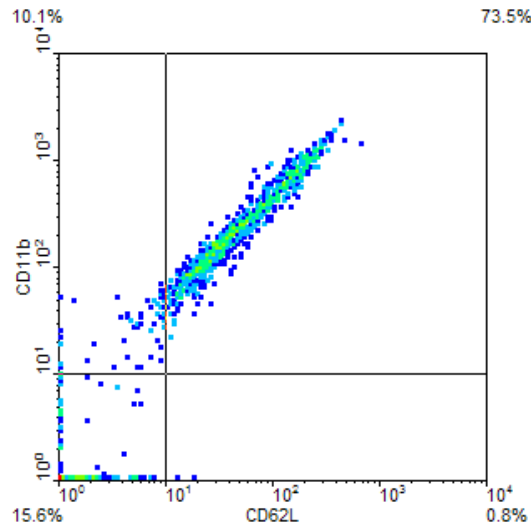
**Fig. 42 - FACs controle negativo 2 horas.**

Avaliação da população de neutrófilos por citometria de fluxo observando a intensidade de fluorescência dos marcadores CD-62L (L-selectina) e CD-11b (integrina  $\alpha$ m) expostos na membrana citoplasmática. Neutrófilos sem ativação (controle negativo), após 120 minutos apresentando CD-62L e CD-11b em níveis basais. Não houve diferenças significativas entre os tempos.



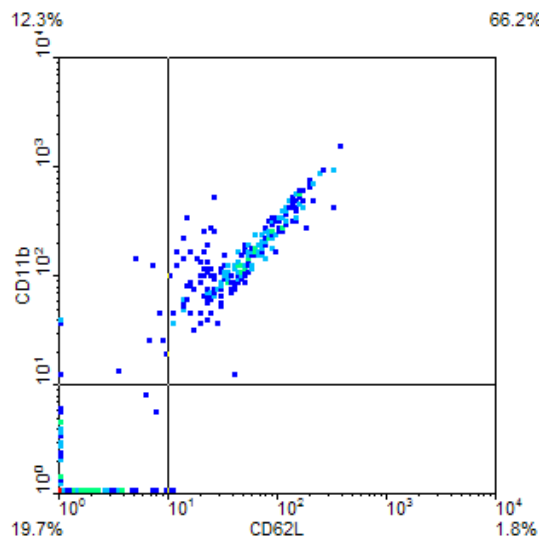
**Fig. 43 - FACs controle positivo (PMA) 2 horas.**

Avaliação da população de neutrófilos por citometria de fluxo observando a intensidade de fluorescência dos marcadores CD-62L(L-selectina) e CD-11b (integrina  $\alpha$ m) expostos na membrana citoplasmática. Neutrófilos expostos ao PMA (controle positivo) após 120 minutos apresentaram diminuição na intensidade de fluorescência de CD-62L e elevação na intensidade de fluorescência de CD-11b em comparação ao controle negativo. Não houve diferenças significativas entre os tempos.



**Fig. 44 – FACs Placa lisa 2 horas**

Avaliação da população de neutrófilos por citometria de fluxo observando a intensidade de fluorescência dos marcadores CD-62L (L-selectina) e CD-11b (integrina  $\alpha$ m) expostos na membrana citoplasmática. Neutrófilos expostos a placas lisas após 120 minutos apresentaram uma pequena elevação na intensidade de CD-62L e CD-11b em comparação ao controle negativo, porém não significativa, já no controle positivo (PMA), as placas lisas demonstraram intensidades aumentadas para CD-62L e diminuída para CD-11b, ambas significativas. Quando comparado a placa rugosas no mesmo tempo o comportamento foi semelhante. Não houve diferenças significativas entre os tempos.



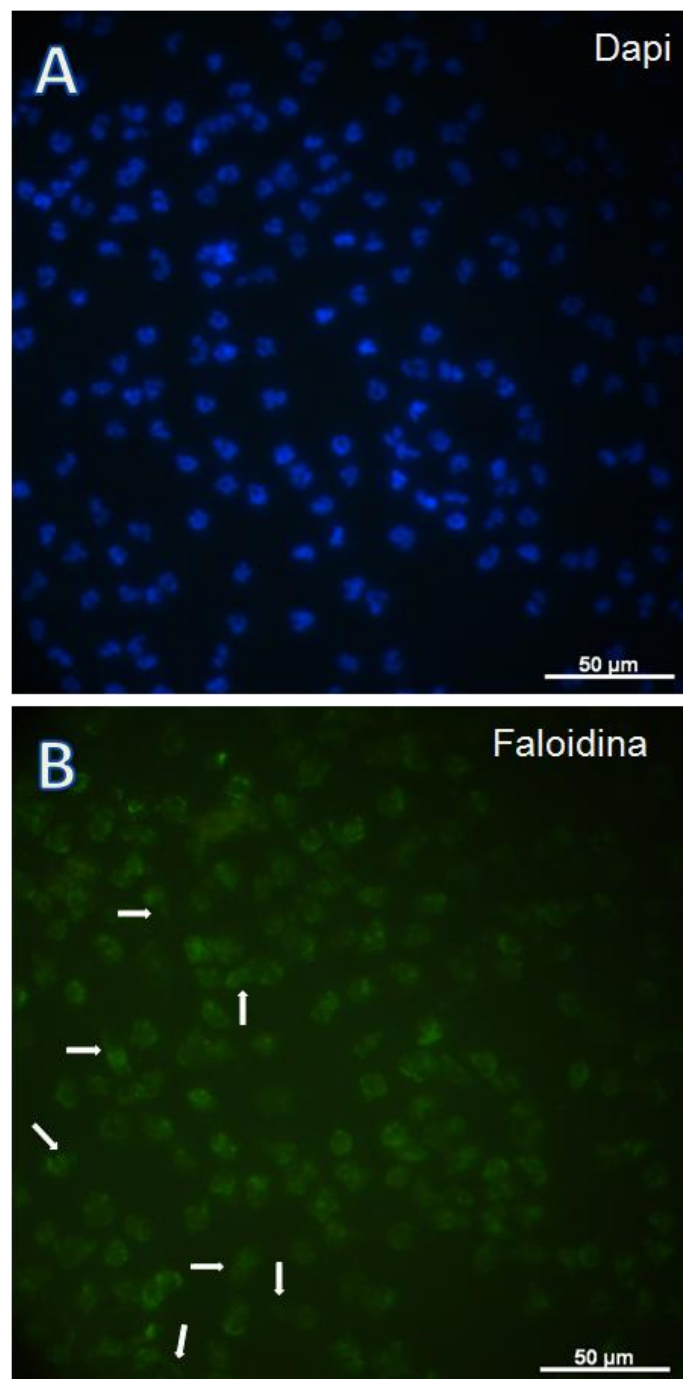
**Fig. 45 – FACs Placa rugosa 2 horas**

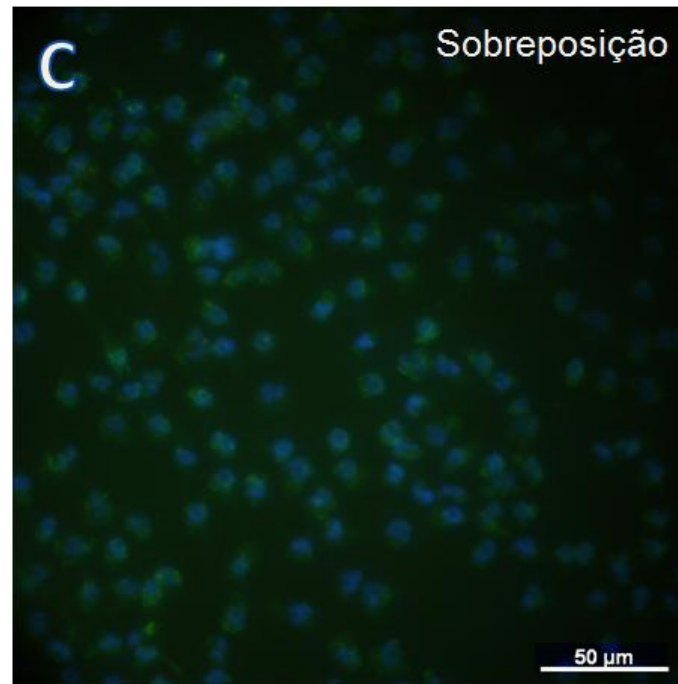
Avaliação da população de neutrófilos por citometria de fluxo observando a intensidade de fluorescência dos marcadores CD-62L(L-selectina) e CD-11b (integrina  $\alpha$ m) expostos na membrana citoplasmática. Neutrófilos expostos a placas rugosas após 120 minutos apresentaram uma pequena elevação na intensidade de CD-62L e CD-11b em comparação ao controle negativo, porém não significativa, já no controle positivo (PMA), as placas rugosas demonstraram intensidades aumentadas para CD-62L e diminuída para CD-11b, ambas significativas. Quando comparado a placa lisas no mesmo tempo, o comportamento foi semelhante. Não houve diferenças significativas entre os tempos.

## 5.7. Microscopia de fluorescência

Nessa parte do experimento, os neutrófilos foram caracterizados com o Dapi (marcador nuclear), Faloidina (marcador de actina) e a presença de marcadores de adesão fraca (CD-62L) localizados em suas membranas.

Aspectos morfológicos revelaram a relação entre a formação de filamentos actínicos e projeções da membrana plasmática. Conforme mostrado a seguir (Figuras 42, A B e C).

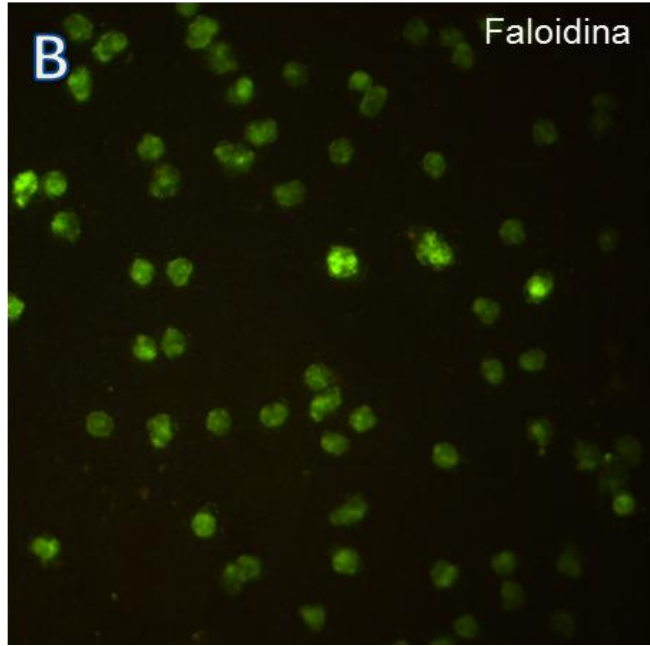
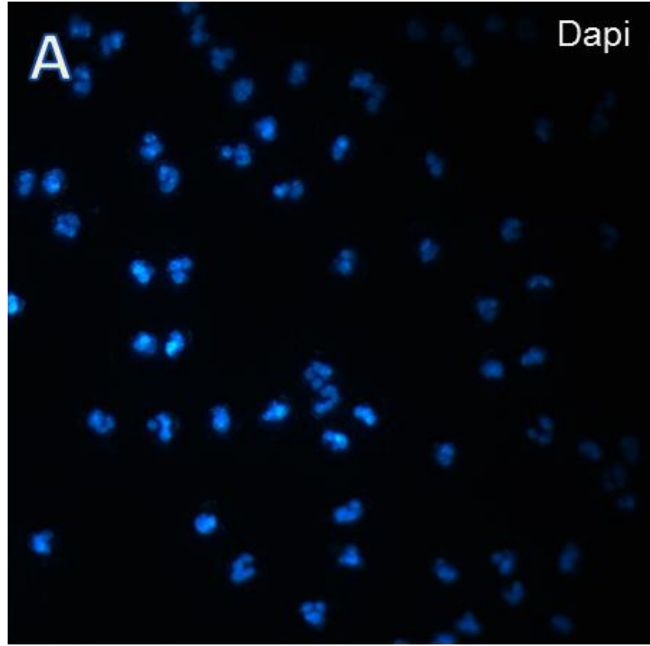




**Fig. 46 - Adesão de neutrófilos em substrato metálico liso (Ti) – 5 min**

Diversas células apresentam aspecto típico de projeções na membrana plasmática (setas), sugerindo a interação entre as moléculas da superfície celular e o substrato metálico liso. São facilmente identificáveis nestas células as projeções da membrana plasmática guiada pelos microfilamentos formando os pontos de adesão focal. Estas estruturas são sempre presentes em células aderentes e é amplamente documentadas na literatura científica (Kate et al., 2008; Kevin et al., 2009). Os aspectos morfológicos dos microfilamentos observados nessas células, fortemente sugerem um processo inicial de associação entre as células e o substrato metálico da superfície lisa que antecede as mudanças morfológicas apresentadas por diversos tipos aderidos às superfícies. Fig. 46A - núcleos marcados (azul Dapi), Fig. 46B – actina (verde Faloidina/488). Fig. 46C – sobreposição.





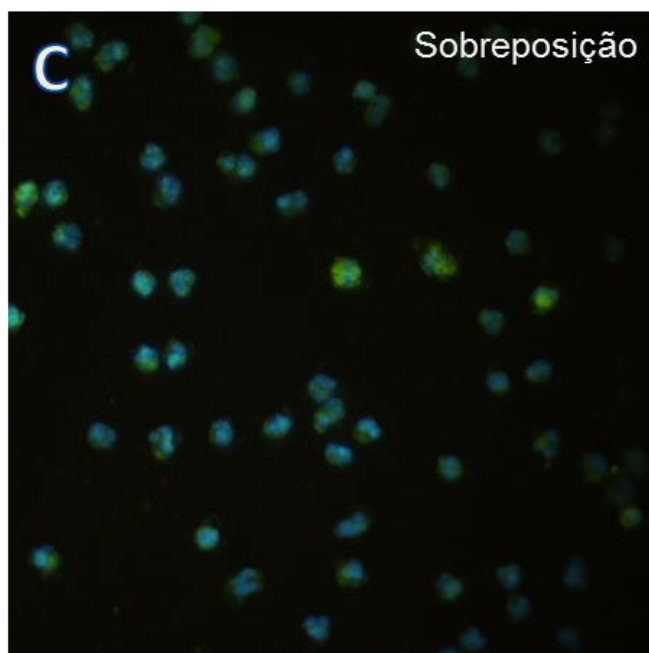


Fig. 47 - Adesão de neutrófilos em substrato metálico rugoso (Ti) – 5 min

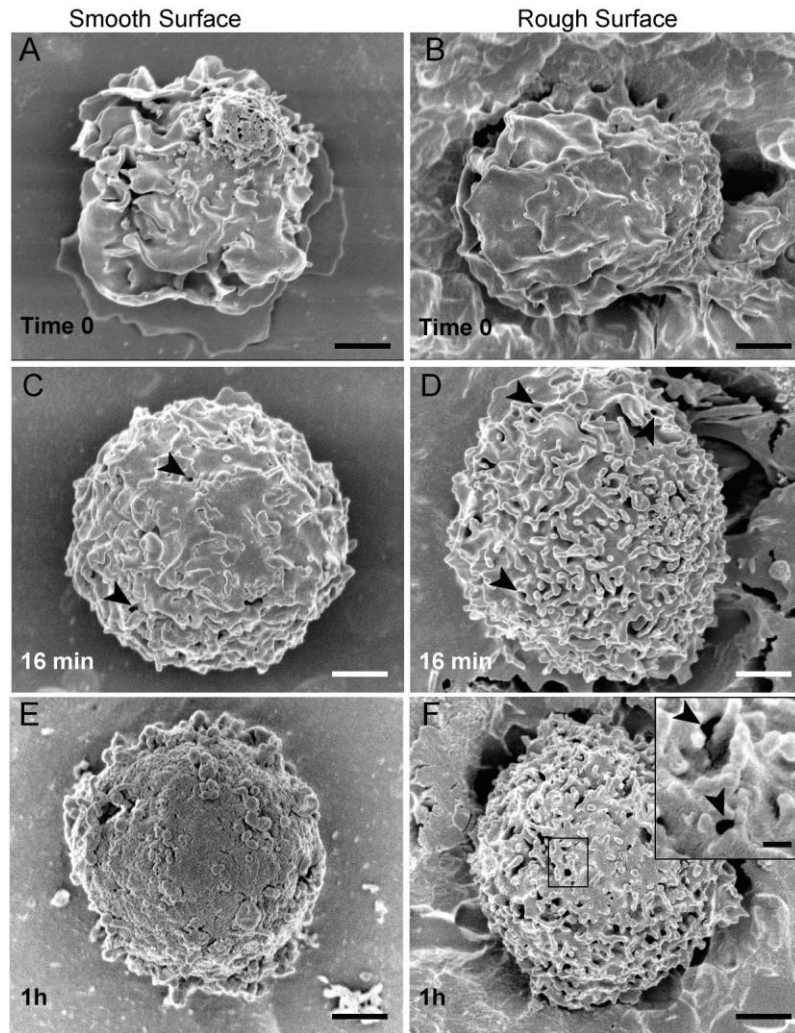
As células apresentam aspecto arredondado, sem projeções visíveis da membrana plasmática, sugerindo a não interação entre as moléculas da superfície celular e o substrato metálico rugoso. Nos processos de adesão entre células e diversas superfícies de contato, os microfilamentos apresentam posicionamento e distribuição típicos nos pontos de adesão focal, que são projeções da membrana plasmática nas regiões de interação entre as extremidades das células e a superfície de contato. Tais aspectos estruturais não são identificados nestas imagens. Fig. 47A - núcleos marcados (azul Dapi), Fig. 47B – actina (verde Faloidina/488). Fig. 47C – sobreposição.

## 5.8. Análise morfológica dos neutrófilos

Neutrófilos exibem morfologias distintas nas duas superfícies. Como os polimorfonucleares neutrófilos (PMN) representam a maior população dentre os leucócitos nas respostas inflamatórias disparadas pelos biomateriais (Barbosa *et al.*, 2004; Eriksson *et al.* 2001c), e como foi observada diferença na força de adesão a cada uma das superfícies, foi estudada a morfologia dessas células, nas superfícies lisas e rugosas, após diferentes tempos de interação. A caracterização morfológica das células nas superfícies de Ti foi realizada com auxílio da MEV.

Células aderidas foram observadas em ambas as superfícies em todos os tempos analisados. Aos quinze minutos a maioria das células exibiu uma morfologia achatada com um leve espalhamento. Entretanto, células aderidas às superfícies rugosas apresentaram claramente uma alta proporção de *villi* e dobras, comparada aos PMN nas superfícies lisas, o que pode ser notado ao se comparar as figuras 48C e 48D. Além do mais, células nas superfícies rugosas (Fig. 48D), seta, caracterizam-se pela presença de invaginações (aproximadamente 80-20nm de

diâmetro), os quais aumentam em número após uma hora de interação (Fig. 48F, seta). Essas invaginações são também observadas em menor proporção nas células expostas às superfícies lisas (Fig. 48C, setas), provavelmente relacionadas com a captação de moléculas do meio. É preciso analisar esse resultado pois, nos tempos iniciais, a morfologia celular é grandemente influenciada pela superfície rugosa, a qual , propicia maior imbricamento e acomodação das células. Já a microscopia de fluorescência mostra maior complexidade das células interagindo com superfícies lisas, nos mesmos períodos iniciais. Duas horas após a interação, as características morfológicas dos PMN aderidos às superfícies lisas versus rugosas mostraram-se muito diferentes (Fig. 51). Enquanto a maioria das células nas superfícies lisas apresentaram uma morfologia achatada, porém, com menor número de pseudópodes, as células aderidas às superfícies rugosas estavam espalhadas, exibindo maior número de pseudópodes, e extensa área de adesão ao Ti, conforme pode ser observado ao se comparar as figuras 49A e 49B. Para quantificar a área de adesão dos PMN em ambas as superfícies, um total de cento e doze células foram delineadas (Figs. 49Ai e 49Bi) e a área medida. PMN aderidos às superfícies rugosas apresentaram área de adesão ou espalhamento quatro vezes maior, comparada às células aderidas às superfícies lisas (média  $\pm$  MEV de  $132.57 \pm 5.66\mu\text{m}^2$  e  $32.36 \pm 0.78\mu\text{m}^2$  respectivamente,  $P < 0.01$ ), (Fig. 46C). Além do que, essas células apresentaram proeminentes alterações na forma (Figs. 49B e 49Bi) e extensas projeções nas superfícies citoplasmáticas (Fig. 51B, setas). O número dessas projeções foi claramente maior nos PMN aderidos às superfícies rugosas (Fig. 48), em comparação com as células nas superfícies lisas (Fig. 48), as quais apresentam grandes projeções nas superfícies, apenas ocasionalmente (Fig.56). A morfologia dos neutrófilos após duas horas de interação, entretanto, não reflete uma força de adesão diferenciada das células com as superfícies, como mostrado na (Fig. 28).



**Fig. 48 - Microscopia eletrônica de varredura: polimorfonucleares neutrófilos.**

Microscopia eletrônica de varredura de polimorfonucleares neutrófilos humanos (PMN) aderidos às superfícies de Ti lisas (A,C,E) e rugosas (B,D,F) após diferentes tempos de contato. Aos quinze minutos (C,D) e uma hora (E,F), PMNs nas superfícies rugosas (D,F) grande número de vilosidades nas superfícies e dobras, comparado às células aderidas às superfícies lisas (C,E). Notar a presença de pequenas invaginações nas superfícies das células (C,D,F, setas). O número dessas invaginações é maior nos PMNs nas superfícies rugosas(D), comparado às células nas superfícies lisas (C) estando claramente aumentados nas superfícies rugosas (F). A área mostrada em maior aumento (F) apresenta invaginações em maior aumento. PMNs foram isolados (ver material e métodos), expostos às superfícies de Ti e preparados para a MEV. Barra, 1 $\mu$ m (A-F); 200nm (inset). Invaginações

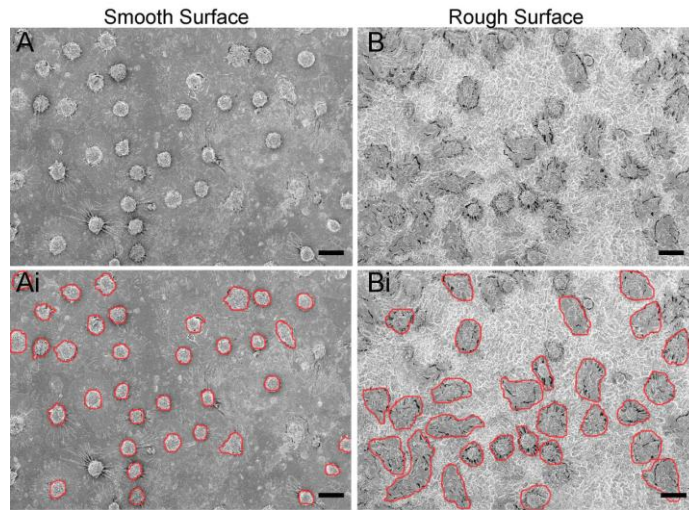


Fig. 49 - Área de adesão dos PMN em ambas as superfícies.

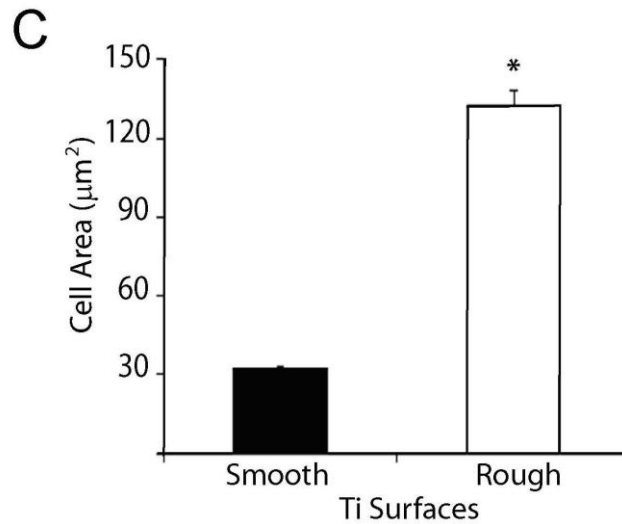
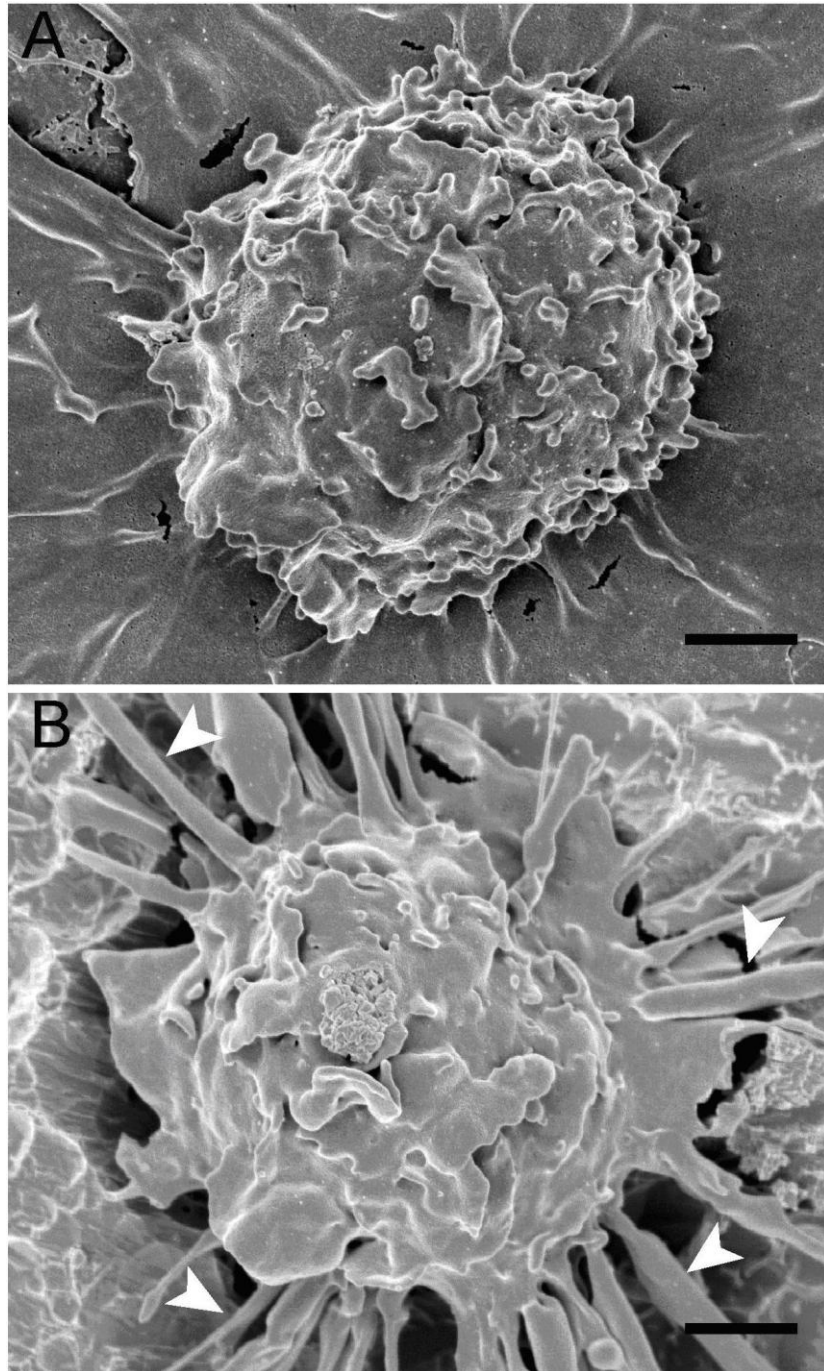


Fig. 50 - Gráfico da área de adesão celular nas superfícies lisas e rugosas.

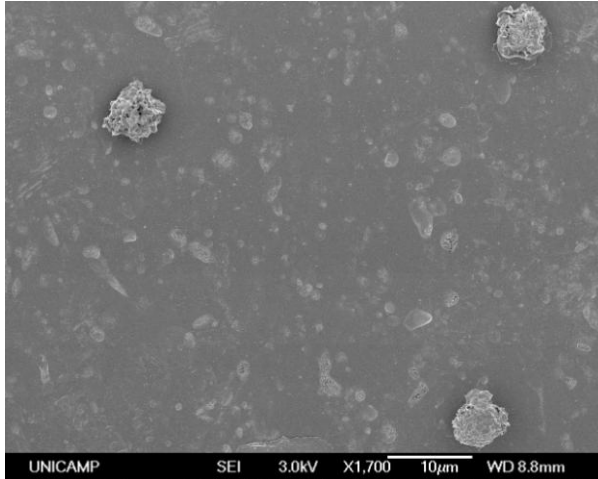
Polimorfonucleares humanos (PMNs) nas superfícies rugosas apresentam maior área de adesão do que nas superfícies lisas após duas horas de interação. Células achatadas e arredondadas predominam respectivamente nas superfícies rugosas (B e Bi) e lisas (A e Ai). Em Ai e Bi, as células estão delineadas em vermelho. (C) A área da superfície de adesão por  $\mu\text{m}^2$  é significativamente maior em células nas superfícies rugosas, comparado com as lisas ( $P < 0.01$ ). PMNs foram isolados, expostos às superfícies de Ti e preparados para a MEV. Um total de 112 células foram medidas usando um software imageJ e os dados foram comparados pelo método de Mann Whitney "U". Barra,  $10\mu\text{m}$ .



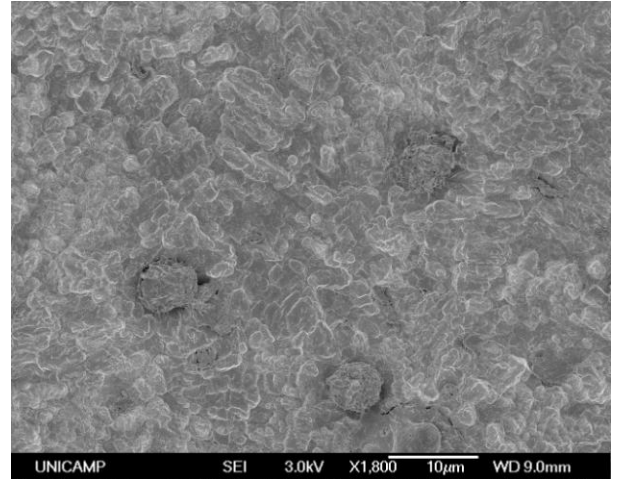
**Fig. 51 - Projeções do citoplasma de PMNs neutrófilos em aumento de 12.000x.**

Projeções citoplasmáticas de polimorfonucleares neutrófilos induzidas pelas superfícies de Ti. Células aderidas á superfícies rugosas (B) apresentam maior proporção de projeções citoplasmáticas (setas), comparado com células interagindo com superfícies lisas (A). PMNs foram isolados, expostos às placas de Ti e preparados para a MEV. Tempo de contato, 2h. Barra, 1µm.

As figuras 52 e 53, embora exibidas em menor aumento, mostram que nesse tempo inicial de interação (5 min.) as células demonstraram estar aparentemente melhor estimuladas na superfície rugosa. Entretanto a microscopia de fluorescência mostra nessa fase, uma montagem citoesquelética mais complexa na superfície lisa (Fig. 46). Observar também nas figuras a diferença na texturização das superfícies.



**Fig. 52 - MEV Morfologia celular: placa lisa, tempo 0 e 1700x.**

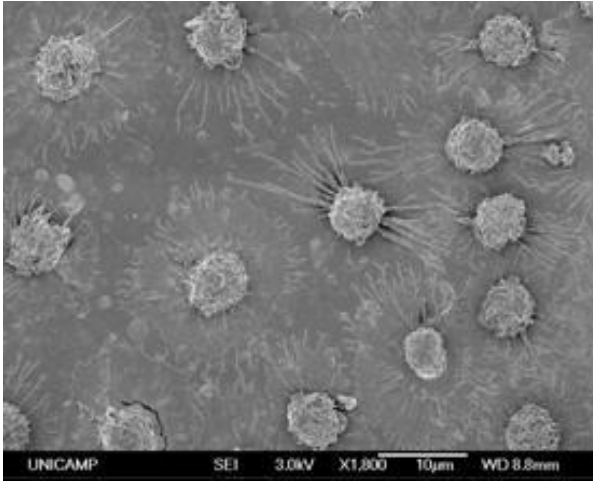


**Fig. 53 - MEV Morfologia celular: placa rugosa, tempo 0 e 1800x.**

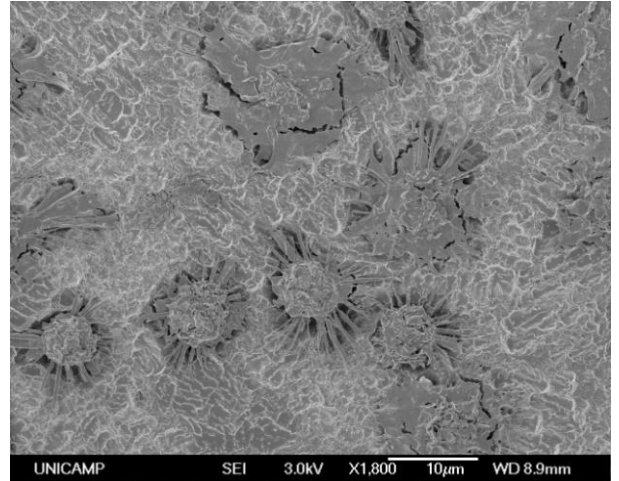
A (Fig. 52) mostra a presença de três neutrófilos interagindo com a superfície de Ti. Nesta fase pode-se notar a característica da superfície lisa, com neutrófilos exibindo formas não esféricas e fase inicial do processo de ativação.

A (Fig. 53) exibe alguns neutrófilos interagindo com a superfície rugosa possivelmente ainda não ativados. Considerar o tempo de contato e o pequeno aumento da imagem.

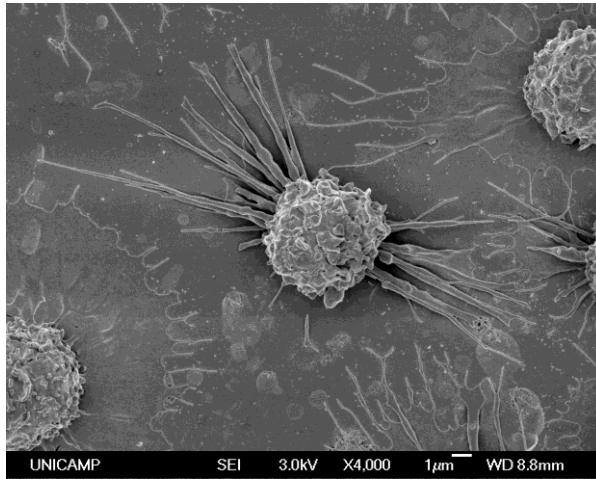
Nas figuras 54 a 57 podemos observar a morfologia das células interagindo com as duas superfícies de Ti por 2h. Os neutrófilos apresentam nesse momento, uma morfologia bem mais complexa se comparado os tempos de interação anteriormente considerados. As células, em ambas as placas, apresentam-se em um estado mais avançado de ativação, exibindo lamelas, uropódios, filipódios e, nos maiores aumentos (Fig. 56 e 57) nota-se também invaginações. Embora presentes nas células em ambas as placas, as características morfológicas são aparentemente mais visíveis nas placas rugosas. Importante notar que na placa lisa há várias células exibindo diferentes morfologias, nesse momento, representado por formas distintas. O padrão morfológico das células, na superfície rugosa é mais regular.



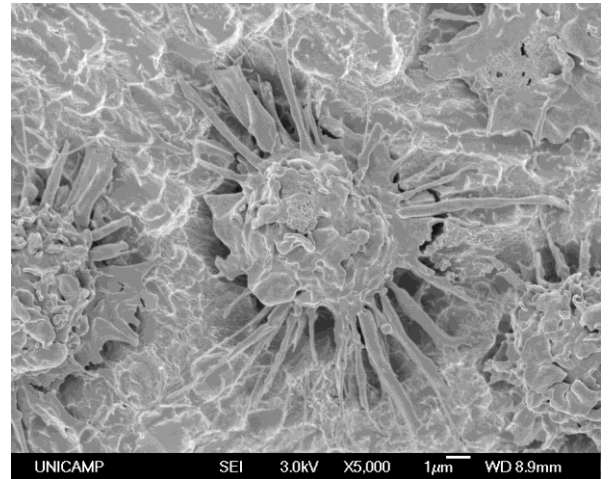
**Fig. 54 - MEV Morfologia celular: placa lisa, tempo 2h e 1800x.**



**Fig. 55 - MEV Morfologia celular: placa rugosa, tempo 2h e 1800x.**



**Fig. 56 - MEV Morfologia celular: placa lisa, tempo 2h e 5000x.**



**Fig. 57 - MEV Morfologia celular: placa rugosa, tempo 2h e 5000x.**

A Fig. 54 mostra diversos neutrófilos em fases distintas de ativação. Algumas exibem o espalhamento do seu citoplasma de forma irradiada e bastante simétrica. Outras mostram a fase inicial de emissão de pseudópodes. Uma delas, destaca-se das demais ao exibir pseudópodes bem definidos porém, no mesmo sentido e em direções opostas. As superfícies lisas aparentemente dificultam a adesão celular. Este fenômeno é conhecido como “contact guidance”, e de importância no tratamento das superfícies pois, objetiva direcionar a migração das células.

A Fig. 55 podemos observar vários neutrófilos em uma semelhante e adiantada fase de ativação. Os seus pseudópodes irradiam-se espacialmente.

As Figs. 56-57 representam respectivamente as figuras 54 e 55 em maior aumento.



## 6. Discussão

Sabe-se que os implantes osteointegrados foram pesquisados no início da década de 50, na Suécia, por Branemark e colaboradores e introduzidos no mercado em 1965. Eram fabricados em liga de titânio, vanádio e alumínio (TiAl6V4), passando atualmente a serem fabricados em Ti comercialmente puro, devido à indiscutível biocompatibilidade desse elemento. Apesar do sucesso cientificamente comprovado dos implantes, a superfície, inicialmente lisa, dos implantes Branemark, vem sendo modificada por diversos tipos de tratamento, cujo objetivo é aumentar a sua rugosidade superficial. A topografia da superfície e as interações das células com os implantes determinam a previsibilidade da interação entre os tecidos e o implante. Embora a influência das características das diversas superfícies na sobrevida dos implantes ao longo do tempo, tenham sido estudadas por vários autores (Albrektsson, 1983; Branemark, 1993; Nygren, 1997; Testori *et al.*, 2003) não se sabe até o momento, qual o melhor tratamento e / ou topografia.

Como os neutrófilos são as primeiras células de defesa a entrar interagir com os implantes, imediatamente após a sua colocação, nessa pesquisa optamos pelo estudo dessa célula. A avaliação das suas reações iniciais no processo inflamatório e a caracterização da sua morfologia e adesão, poderão acrescentar dados quanto a ainda indefinida, escolha da topografia das superfícies dos biomateriais. Trabalhos anteriores, já citados nessa pesquisa, rotineiramente avaliam respostas celulares na presença de sangue total, considerando a influência de moléculas adsorvidas às superfícies, durante a colocação dos implantes, além de outros componentes plasmáticos. Entretanto, o contato direto entre neutrófilos e Ti, sem interveniência do “*cross-talk*” entre células e mediadores do processo inflamatório, indica mecanismos de modulação de atividade neutrofílica ainda obscuros, no processo de adesão e ativação celulares.

A escolha de uma superfície lisa e outra rugosa, nos permitiu avaliar características de dois tratamentos distintos. Como poucas são ainda as pesquisas em relação à células de defesa em direto contato com superfícies de Ti, objetivamos nessa pesquisa o estudo dessas interações. O tratamento com o jato de areia, seguido do ataque ácido, é um dos tratamentos mais usuais e vem sendo utilizado há quatro décadas. A análise das duas superfícies pela MEV nos permitiu comprovar, qualitativamente, as diferenças nas topografias, enquanto pela MFA, tais

diferenças foram corroboradas e quantificadas. A EDX mostrou uma composição elemental semelhante entre as superfícies, mostrando a eficácia do duplo ataque ácido na eliminação de contaminantes. É sabido que determinados tratamentos podem agregar contaminantes às superfícies, causando danos aos tecidos periimplantares. Nesse estudo, foi possível constatar que as diferenças de comportamento celular entre as duas superfícies devem-se a diferenças de textura e não de composição elemental. A pesquisa, corrobora trabalhos anteriormente descritos na literatura (Tang, 1993; Einhorn, 1995; Albrektsson, 1983) que apresentam claras evidências da melhor performance das superfícies rugosas comparadas às lisas, sugerindo, no entanto, mecanismos ainda não descritos nos referidos artigos.

Foram ainda avaliados os ângulos de contato, ou molhabilidade, entre as diferentes placas. Essa análise mostrou resultados distintos, comprovando que as superfícies rugosas apresentam maior molhabilidade, representada pelo menor ângulo de contato líquido/superfície, ou seja, são mais hidrofílicas. A determinação dos ângulos de contato evidenciou uma característica que possivelmente influencia a adesão e a morfologia de células nessas superfícies. Esse resultado está de acordo com trabalhos anteriores e, é conhecido que o escoamento da água ou hidrofiliidade está aumentado em superfícies rugosas. É importante enfatizar a hidrofiliidade na função celular. O ângulo de contato parece, portanto, um parâmetro a ser considerado na construção das superfícies de novos biomateriais como, por exemplo, superfícies super hidrofílicas e/ou super hidrofóbicas recentemente desenvolvidas (Dahlgren, 1983).

Uma das características morfológicas marcantes na interação dos neutrófilos com as placas lisas e rugosas, foi a imediata formação de lamelas (Fig. 48A). As modificações, culminando com o surgimento de filipódios irradiando-se do corpo celular, após duas horas da interação, continuam como característica de sucessivas modificações nas duas placas. Em todos os tempos de contato, porém, as alterações morfológicas são mais evidentes nas placas rugosas, incluindo a presença de invaginações, o que lhes confere ser, mais competentes na ativação dessas células. Como a adesão é uma característica importante na função neutrofílica, antecedendo a migração e fagocitose, a mesma mostrou-se um aspecto relevante, antecedendo a formação de vilosidades que conferem a essas células, maior área de espalhamento.

Uma vez que se comprovou a nítida diferença de textura entre as placas e que neutrófilos realizam processo de adesão, avaliou-se no presente estudo a diferença de adesão entre os dois tipos de placa e a diferença de adesão em função do tempo de interação entre as células e a placa. Observou-se que a adesão é significativamente maior nas placas rugosas que nas lisas nos primeiros 30 minutos e que a adesão aumenta ao longo do tempo nesse mesmo período.

Como a adesão sofre provável influência da topografia da placa mesmo na ausência de outros componentes bioquímicos, avaliou-se a morfologia das células também comparando-se as duas superfícies e ao longo do tempo. Observa-se que as diferenças morfológicas entre as células nas placas lisas x rugosas, não ocorrem somente nos tempos de 5 e 30 min. Há também notáveis diferenças na variação dos tempos entre 60 e 120 min, sendo entretanto, mais nítidas após 30 min. Ao longo do tempo, as características morfológicas parecem se diferenciar progressivamente tanto nas superfícies lisas quanto nas rugosas, sendo as características (grau de complexidade) mais marcantes nas superfícies rugosas em todos os tempos analisados, excetuando-se os tempos iniciais onde é maior o imbricamento e a acomodação celular.

Dessa forma, parece haver alguma coincidência entre o comportamento de adesão e as alterações morfológicas para os momentos iniciais após a interação (até 30 minutos). Já para os momentos subseqüentes tal paralelismo não se observa, pois as alterações morfológicas continuam a progredir embora a força de adesão permaneça constante, diferentemente do que afirmam autores que correlacionam diretamente as alterações morfológicas à adesão (Einhorn, 1995; Martin, 1995).

Apesar de terem sido observadas diferenças morfológicas e de adesão entre as superfícies e ao longo do tempo, as diferenças morfológicas não parecem ter o mesmo comportamento que a adesão, sugerindo mecanismos de adesão que estejam relacionados não somente a interações físicas por imbricamento da célula na superfície, mas também interações em nível molecular independentes de manifestação morfológica.

Pensando em avaliar possíveis moléculas de interação que explicassem tais diferenças, optou-se por estudar a presença de dois marcadores característicos do processo de adesão de neutrófilos, CD-62L e CD-11b.

A citometria de fluxo foi um método utilizado na pesquisa, sendo uma técnica que permite não apenas a contagem de células, como também separá-las por tamanho ou granulosidade, além de caracterizar populações de células em relação a marcadores fluorescentes. Utilizando os marcadores de adesão de superfície das membranas celulares, CD-62L e CD-11b, relacionados respectivamente com o processo de rolagem e adesão firme dos neutrófilos, as células foram expostas ao conjugado anti-CD-62L (FITC) e anti CD-11b (R-PE).

Neutrófilos são células efetoras do processo inflamatório, ativadas por vários mediadores. A quimiotaxia é o primeiro sinal da ativação fisiológica dos neutrófilos. Esse evento começa com a rolagem dos neutrófilos no endotélio das vênulas pós capilares, onde há uma diminuição da sua velocidade em função de moléculas de adesão fraca (selectinas).

É oportuno lembrar que, *in vivo*, os neutrófilos, após a marginação e durante o processo de rolagem, expressam L-selectinas, cujo ligante (PSGL-1) é expresso pelo endotélio, e responsável pela desaceleração neutrofílica. A próxima etapa do processo é representada pela adesão firme, com participação das integrinas, culminando com a transmigração desses granulócitos. É preciso portanto, inquirir sobre outros possíveis mecanismos ou vias, pelas quais essa célula liga-se tão prontamente, *in vitro*, ao Ti. Em experimentos anteriores, utilizando-se sangue total, diversos autores demonstraram a importância do fibrinogênio, IgG e albumina e outros componentes na adesão celular. Na interação direta neutrófilo/superfície de Ti, excetuando a presença das proteínas anteriormente mencionadas, que outros fatores, relacionados às superfícies ou estímulo celular estariam envolvidos na adesão?

A ligação dos neutrófilos ao endotélio pode ser rompida pelo movimento de rolagem, por ação do fluxo sanguíneo ou por clivagem proteolítica por uma metaloprotease liberada por neutrófilos e linfócitos. A ativação do neutrófilo está associada com a expressão diminuída de L-selectina e, com o aumento na expressão do complexo Mac-1 ( $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ , CD-11b/CD-18). A ligação da L-selectina com o seu ligante PSGL-1 promove a sinalização em cascata, resultando na exposição das integrinas (Albrektsson, 1983). Vários ativadores, como PMA, fMLP, LPS e IL-1, induzem a adesão dos neutrófilos por exposição à Mac-1 (Branemark, 1993).

Um fato que nos chama a atenção nos resultados é que, embora a força de adesão dos neutrófilos às placas rugosas, nos tempos iniciais do contato (5 min.

e 30 min.), (Fig.33), seja maior, comparado às lisas, a expressão de L-selectinas, constitutivamente presentes nas superfícies celulares e removidas durante a ativação, não foi menor. Isso nos leva a pensar que, possivelmente, a maior adesão das células às superfícies rugosas, talvez esteja relacionada a um possível maior imbricamento dessas células às superfícies mais texturizadas e/ou à influência de outras moléculas de adesão.

A interação com as diferentes placas induziu expressão de CD-62L em um número maior de células comparado ao controle positivo e menor que o controle negativo. Nota-se, portanto, alguma remoção de CD-62L, ainda que indistinta, em relação à textura da placa e em função do tempo. Tal constatação confirma a ativação pela interação com o titânio, e nos informa que esse não seria o mecanismo responsável pela diferente adesão entre as placas.

O número de células apresentando CD-11b foi menor em ambas as superfícies de Ti comparado aos controles negativo e positivo. A média da intensidade de fluorescência (indicador indireto da quantidade de moléculas expostas) de CD-11b nas superfícies celulares não foi significativamente diferente, comparando-se o contato com placas ao controle negativo, sendo porém observado menor quantidade de CD-11b, comparando-se a interação com placas ao PMA. Como seria de se esperar, a exposição constitutiva de CD-11b nas membranas tanto de células quiescentes quanto de células ativadas revelou populações que diferiam apenas em relação à intensidade média de fluorescência para os controles positivo e negativo. Já a observação de uma população reduzida apresentando tal componente conseqüente à exposição a qualquer uma das superfícies de titânio sugere um mecanismo que envolva clivagem, enzimática ou mecânica, dessas moléculas de adesão.

Os marcadores utilizados, CD-62L e CD-11b mostraram um comportamento em relação às placas de titânio que independe do tempo (nos intervalos estudados) e independe da topografia da placa, apesar de revelar alterações quantitativas comuns às placas e aos tempos estudados. Dessa forma, também não explicam as alterações de força de adesão e de morfologia discutidas anteriormente.

Nesse estudo foram abordados os eventos iniciais da interação célula-implante. Várias pesquisas têm estudado a relação entre células e superfícies implantares, em termos de semanas ou meses, enquanto pouco é conhecido sobre os eventos iniciais nas interações celulares (Borregaard, 1994; Nusbacher, 1978).

Imediatamente após o contato dos neutrófilos com as diferentes placas de Ti, as células são removidas mais facilmente das superfícies lisas que das rugosas porém, após trinta minutos, a quantidade de células removidas diminui e as diferenças tornam-se menos evidentes. Finalmente, a partir de sessenta minutos, o número de células removidas é bastante semelhante entre as superfícies. Tanto as L-selectinas quanto CD-11b, foram detectadas como presentes em uma população reduzida de neutrófilos expostos ao titânio, porém tal mecanismo de adesão independe da topografia da placa e do tempo de exposição. Como a adesão é importante sucessora de uma cascata de eventos, essa pesquisa concentra-se em avaliar a morfologia de células interagindo com tais superfícies. É preciso considerar sempre o aspecto multidisciplinar nas pesquisas, no campo da implantodontia.

A microscopia de fluorescência foi relevante no trabalho pois, o processo da adesão celular, *in vivo*, está relacionado diretamente com a polimerização da actina do citoesqueleto (Kate *et al.*, 2008; Kevin *et al.*; Jun-Sub *et al.*; Kristin *et al.*, 2009). Embora, nos tempos iniciais do experimento (cinco e trinta minutos), haja uma montagem do citoesqueleto, mais expressiva nas células interagindo com as placas lisas, esse fato não está correlacionado com maior adesão ao substrato liso. A adesão dos neutrófilos, mais firmemente ao substrato rugoso, especialmente nos tempos iniciais da interação célula/substrato, provavelmente é devido ao maior imbricamento à superfície rugosa e possível concentração de contatos focais (Prerna *et al.*; Chinten *et al.*, 2008; Kevin *et al.*, 2009).

## 7. Conclusões

Os resultados permitem concluir que os PMNs aderem diferentemente às superfícies de Ti com diferentes topografias na ausência de outros componentes celulares ou plasmáticos. Os neutrófilos nessas condições apresentam consistentes características morfológicas, típicas de células ativadas e que, as superfícies rugosas são mais efetivas na indução da adesão, comparadas às superfícies lisas, como mostrado nos períodos de tempo iniciais. Embora as células estejam mais aderidas às superfícies rugosas nos tempos iniciais do experimento (força g), o citoesqueleto actínico encontra-se em um estágio mais avançado de polimerização nas células interagindo com as superfícies lisas. Esse fato provavelmente está relacionado com o imbricamento das células na superfície rugosa. O padrão das alterações morfológicas é progressivo ao longo de todo o tempo estudado em ambas as superfícies, embora o mesmo não esteja relacionado com características de adesão. Além do mais, ficou demonstrado que a exposição de L-selectina e CD-11b é influenciada pela interação dos neutrófilos com o Ti, mas não pela diferença entre a textura das superfícies. O processo de adesão pode ocorrer independente de outras células ou mediadores plasmáticos. Mais estudos serão necessários para determinar as vias que levam às diferenças iniciais de forças de adesão entre as células expostas a superfícies diferentemente tratadas e às alterações morfológicas observadas durante todo o processo de adesão estudado. Proteínas de adesão são produzidas e expressas por essas células em direto contato com superfícies de Ti, lisas e rugosas.

Finalmente, não há relação entre força de adesão, complexidade na montagem do citoesqueleto e morfologia celular, na interação dos neutrófilos com superfícies de Ti lisas e rugosas nas condições estudadas.

## 8. Perspectivas

Avanços na ciência dos materiais têm beneficiado o desenvolvimento da bioengenharia e nanotecnologia das superfícies, portanto, a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares reguladores das interações das células e implantes deverá propiciar melhorias na topografia dos futuros implantes. Um enfoque multidisciplinar, envolvendo a engenharia de materiais, biologia celular e molecular, além da bioquímica, deverá sempre nortear as pesquisas no campo da implantodontia e ciência dos biomateriais.

O presente estudo levantou pontos que demandam elucidação por pesquisas futuras, como, por exemplo:

- Diferentes níveis de texturização afetariam de maneira diferente a adesão de neutrófilos? Outros estudos quantificando, talvez por MFA como este, a texturização por diferentes técnicas poderiam comparar tais características à dinâmica de adesão de neutrófilos
- Que mecanismos levaram à adesão diferenciada nos tempos iniciais entre as duas superfícies estudadas?
- Que mecanismos levaram às alterações morfológicas diferenciadas entre as duas superfícies, mesmo quando a força de adesão já era similar?
- Na ausência de outras células e proteínas plasmáticas, quais receptores e vias de ativação estão envolvidos no contato direto e interação entre células e implantes?
- Qual a influência a longo prazo, dos eventos iniciais do processo inflamatório, diferentemente desencadeados por distintas superfícies, na sobrevida dos implantes?
- A avaliação qualitativa de mediadores químicos do processo inflamatório, elaborado por células interagindo com diferentes substratos, poderá direcionar estudos já em fase de projeto em novas pesquisas.



## Referências Bibliográficas

Adell R. *et al.*, **15-year study on osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw.** Int J Oral SURG, 10: 387-416, 1981.

Ager A. **Regulation of lymphocyte migration into lymph nodes by high endothelial venules.** Biochem Soc Trans. 25:421-428, 1996.

Albelda SM, Smith CW e Ward PA. **Adhesion molecules and inflammatory injury.** FASEB J, 8:504-512, 1994.

Albrektsson T BP, Hansson HA, Kasemo B, Larsson K, Lundstrom I, *et al.*. **The interface zone of inorganic implants in vivo: titanium implants in bone.** Ann Biomed Eng, 11:1-27, 1983.

Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. **Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man.** Acta Orthop Scand, 52:155-70, 1981.

Alon R, Chen S, Puri KD, Finger EB e Springer TA. **The kinetics of L-selectin tethers and the mechanics of selectin-mediated Rolling.** J Cell Biol,138:1169-1180,1997.

Alpin, A. E., A. Howe, *et al.* **Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.** Pharmacol Rev, v.50, n.2, p.197-263, 1998.

Altieri DC and Edgington TS. **A monoclonal antibody reacting with distinct adhesion molecules defines a transition in the functional state of the receptor CD-11b/CD-18 (Mac-1).** J Immunol, 141:2656-2660, 1988.

Andonegui, G., C. S. Bonder, *et al.* **Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs.** J Clin Invest, v.111, n.7, Apr, p.1011-20, 2003.

Anne E Meyer *et al.*, (W.B.) Saunders Co., pág. 32, cap. 3, 1991.

Baier RE. **Surface properties determine bioadhesive outcomes: Methods and results.** J Biomed Mater Res, 18: 337-355, 1984.

Barbosa, J. N., Barbosa, M. A. and Aguas, A. P. **Inflammatory responses and cell adhesion to self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold.** Biomaterials 25, 2557-2563, 2004.

Becker, E. L. Rous-Whipple award lecture. **The formylpeptide receptor of the neutrophil. A search and conserve operation.** Am J Pathol, v.129, n.1, Oct, p.15-24. 1987.

Berton G, Lindahl U. **Integrin signaling in neutrophils and macrophages.** *Cell Signal*, 11:621-635, 1999.

Borregaard N, Kjeldsen L, Sengelov H, Diamond MS, Springer TA, Anderson HC, *et al.* **Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators.** *J Leukoc Biol*, 56:80-7, 1994.

Borregaard, N. e J. B. Cowland. **Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte.** *Blood*, v.89, n.10, p.3503-21. 1997.

Botha, A. J., F. A. Moore, *et al.* **Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges.** *Shock*, v.3, n.3, Mar, p.157-66. 1995a.

Botha, A. J., Moore, F. A., Moore, E. E., Kim, F. J., Banerjee, A. And Peterson, V. M. **Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window.** *Surgery*, v.118, n.2, p.358-64; discussion 364-5. 1995b.

Bothe RT BL, Davenport HA. **Reaction of bone to multiple metallic implants.** *Surg Gynecol Obstet*, 71:598-602, 1940.

Bowers KT, *et.al.*, **Optimization of surface micromorfology for enhanced osteoblast responses in vitro.** *Int J Oral Maxillofac Implants*, 7: 302 -310, 1992.

Branemark PI **Osseointegration and its experimental background.** *J. Prosthet Dent*, 50: 399-410, 1993.

Bruehl RE, Moore KL, Lorant DE, Borregaard N, Zimmerman GA, McEvers RP e Bainton DF. **Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1.** *J Leukoc Biol*, 61:489-499,1997.

Burg, N. D. e M. H. Pillinger. **The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity.** *Clin Immunol*, v.99, n.1, p.7-17. 2001.

C.M. Spillmann, E. Lomakina, R. E. Waugh. **Neutrophil adhesive contact dependence on impingement force.** *Biophysical Journal*, 87:4237-4245, 2004.

Chen, L. W., M. W. Lin, *et al.*, **Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils.** *J Biomed Sci*, v.12, n.2, p.311-9. 2005.

Chinten J. Lim\*, Kristin H. Kain\*, Eugene Tkachenko\*, Lawrence E. Goldfinger\*, Edgar Gutierrez, Michael D. Allen, Alex Groisman||, Jin Zhang, and Mark H. Ginsberg\*. **Integrin-mediated Protein Kinase A Activation at the Leading Edge of Migrating Cells.** *Molecular Biology of the Cell*, 11: 4930-4941, 2008.

Cicchetti, G., P. G. Allen, *et al.*, **Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly.** *Crit Rev Oral Biol Med*, v.13, n.3, p.220-8. 2002.

Condliffe, A. M., L. M. Webb, *et al.* **RhoG regulates the neutrophil NADPH oxidase.** J Immunol, v.176, n.9, p.5314-20. 2006.

Craddock PR, Fehr J, Dalmaso AP, Brigham KL, Jacob HS. **Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes.** J Clin Invest, 59:879-88, 1977.

Crockett-Torabi, E. **Selectins and mechanisms of signal transduction.** J Leukoc Biol, v.63, n.1,p.1-14. 1998.

Dahlgren C, Elwing H. **Inhibition of polymorphonuclear leucocyte locomotion by surface-bound antigen-antibody complexes.** Immunology,49: 329-336, 1983.

Darzynkiewicz, Z., H.A, *et al.* **Methods in Cell Biology.** Academic Press 3, v. 63. 2001.

Davenpeck KL, Steeber DA, Tedder TF e Bochner BS. **P and L-selectin mediate distinct but overlapping functions in endotoxin-induced leukocyte-endothelial interactions in the rat mesenteric circulation.** J Immunol, 159:1977-1986,1997.

De La Cruz et.al., **Immobilized IgG and fibrinogen differentially affect the cytoskeletal organization and bactericidal function of adherent neutrophils.** J Surgic Res, 80:28-34, 1998.

Diamond MS, Springer TA. **A subpopulation of Mac-1 molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM -1 and fibrinogen.** J Cell Biol,120: 545, 1993.

Dorr LD *et al.* **Histologic, biochemical, and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty.** Clin Orthop Relat Res. 1990; 261: 82-95.

Dransfield I, Cabanas C, Barret J e Hogg N. **Interaction of leukocyte integrins with ligand is necessary but not sufficient for function.** J Cell Biol, 16:1527-1535, 1992.

Einhorn, TA. **Enhancement of fracture-healing.** J Bone Joint Surg [Am], 77: 940-956, 1995.

Ekdahl K, Nilsson B, Golander, CG, Elwing,H, Lassen B, Nilsson UR. **Complement activation on radiofrequency plasma modified polystyrene surfaces.** J Colloid Interface Sci,158:121-8, 1993.

Eriksson C, Nygren H. **Adhesion receptors of polymorphonuclear granulocytes on titanium in contact with whole blood.** J Lab Clin Med,137:56-63, 2001a.

Eriksson C, Nygren H. **Polymorphonuclear leukocytes in coagulating whole blood recognize titanium surfaces by different adhesion receptors.** J Lab Clin Med, 137: 296-302, 2001b

Eriksson, C., Lausmaa, J. and Nygren, H. **Interactions between human whole blood and modified TiO<sub>2</sub>-surfaces: influence of surface topography and oxide thickness on leukocyte adhesion and activation.** *Biomaterials* 22: 1987-1996. 2001c.

Fabian I, Kletter Y, Mor S. **Activation of human eosinophil and neutrophil function by haematopoietic growth factor.** *Br J Haematol*, 80:37, 1992.

Faurschou, M. e N. Borregaard. **Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.** *Microbes Infect*, v.5, n.14, p.1317-27. 2003.

Fernandes, E. S., G. F. Passos, *et al.* **Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B1 receptor expression.** *Br J Pharmacol*, v.146, n.2, p.209-16. 2005.

Finger EB, Bruehl, Bainton DF e Springer TA. **A differential role for cell shape in neutrophil tethering and rolling on endothelial selectins under flow.** *J Immunol*, 157:5085-5096,1996.

G. Binnig US Pat. RE 33 387, 1985; G. Binnig, C.F. Quate, Ch. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* 56, 930, 1986.

Giovanna Orsini *et al.*, **Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants.** *Int J Oral Maxillofac Implants*, 15:779-784, 2000.

Grayson MH, van der Vieren M, Gallatin W, Hoffman PA, Staunton DE and Bochner BS. **Alfa d beta2 Integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecules-1 (VCAM-1).** *J Exp Med*, 188:2187-2191,1998.

Groemping, Y. e K. Rittinger. **Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective.** *Biochem J*, v.386, n.Pt 3, p.401-16. 2005.

Hamon L, Curmi PA, Pastré D. **High-resolution imaging of microtubules and cytoskeleton structures by atomic force microscopy.** *Methods Cell Biol*, 95:157-74, 2010.

Henson PM, Henson JE, Fittschen C. **Degranulation and secretion by phagocytic cells.** *Inflammation: New York Raven Press*, Pp. 51-545, 1992.

Henson PM. **The immunologic realisation of constituents from leukocytes.** *J Immunol*, 107: 1547, 1971.

Hinterdorfer, P; Dufrière, Yf. **Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy.** *Nature methods* 3 (5): 347–55, 2006.

Hynes RO. **Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion.** *Cell*, 69: 11, 1992.

Jaan Hong *et al.* **Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: possible implications for osteogenesis.** *Thromb Haemost*, 82:58-64, 1999.

Joseph R. Lakowicz, **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** Ed. Springer, 2006.

Jun-Sub Kim, Timothy Y. Huang, and Gary M. Bokoch. **Reactive Oxygen Species Regulate a Slingshot-Cofilin Activation Pathway.** *Molecular Biology of the Cell*, 11: 2650-2660, 2009.

Kaplan SS, Basford RE, Kormos RL. **Biomaterial associated impairment of local neutrophil function.** *ASAIO Trans*, 36: M172, 1990.

Kasemo B, Lausmaa J. **Surface science aspects on inorganic biomaterials.** *CRC Crit Rev Biocomp*, 2:335-80, 1986.

Kate M. Cooper\*, David A. Bennin, and Anna Huttenlocher. **The PCH Family Member Proline-Serine-Threonine Phosphatase–interacting Protein 1 Targets to the Leukocyte Uropod and Regulates Directed Cell Migration.** *Molecular Biology of the Cell*, 8: 3180-3191, 2008.

Kevin J. Hamill, Susan B. Hopkinson, Philip DeBiase, and Jonathan C.R. Jones. **BPAG1e Maintains Keratinocyte Polarity through  $\beta$ 4 Integrin–mediated Modulation of Rac 1 and Cofilin Activities.** *Molecular Biology of the Cell*, 12: 2954-2962, 2009.

Kieswetter K *et al.* **Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like cells MG 63.** *J Biomedical Res*, 10: 55-63, 1996.

Kim H, Murakami H, Chehroudi B, Textor M, Brunette DM. **Effects of surface topography on the connective tissue attachment to subcutaneous implants.** *Int J Oral Maxillofac Implants*, 21:354-65, 2006.

Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. **Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors.** *Science*, 245:1238-41, 1989.

Kishimoto TK, Kahn J, Migaki G, Mainolfi G, Shirley F, Ingraham SF e Rothlein R. **Regulation of L-selectin expression by membrane proximal proteolysis.** *Agents Actions Suppl* 47:121-134,1995.

Kitchen, E., A. G. Rossi, *et al.* **Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor.** *Blood*, v.88, n.11, Dec 1, p.4330-7. 1996.

Klein CL, Bittinger F, Korhler H, Wagner M, Otto M, Hermanns I e Kirkpatrick. **Comparative studies on vascular endothelium in vitro. 3. Effects of cytokines**

**on the expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 by cultured human endothelial cells obtained from different passages.** Pathobiol, 65:83-92,1995.

Krause DS, Fackler MJ, Civin CI e May DS. **CD-34: Structure, biology and clinical utility.** Blood,87:1-13,1996.

Kristin E. Michael\*, David W. Dumbauld\*, Kellie L. Burns\*, Steven K. Hanks , and Andrés J. García\*. **Focal Adhesion Kinase Modulates Cell Adhesion Strengthening via Integrin Activation.** Molecular Biology of the Cell, 9: 2508-2519, 2009.

Kuijpers, T. W. **Neutrophils.** ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES/Nature Publishing Group, 2001.

Kumazawa R, Watari F, Takashi N, Tanimura Y, Uo M, Totsuka Y. **Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology.** Biomaterials, 23:3757-64, 2002

Kummer FJ et. al. **Plasma treatment of metallic implant surfaces.** J Applied Biomater, 3: 39-44, 1992.

Lars C. **Removal torques for polished and rough titanium implants.** Int J Oral Maxillofac Implant. 3:21-24, 1988.

Lawrence MB and Springer TA. **Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction and prerequisite for adhesion through integrins.** Cell 65: 859-873,1991.

Lawrence MB and Springer TA. **Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction and prerequisites for adhesion through integrins.** Cell, 65:859-873,1991.

Lawrence MB and Springer TA. **Neutrophils roll on selectin.** J Immunol 151:6338-6346,1994.

Lee, Y. M., B. M. Hybertson, *et al.* **Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces.** J Lab Clin Med, v.140, n.5, Nov, p.312-9. 2002.

Leventhal GS. **Titanium, a metal for surgery.** J Bone Joint Surg Am, 33-A:473-4, 1951.

Lewinowitz A, Muhloff J,Isenman S and Vestweber D. **Identification of glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells.** J Cell Biol, 121:449-459, 1993.

Ley K. **Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process.** Cardiovasc Res, 32:733-742,1996.

Li, X., X. Liu, *et al.* **Crystal structure of human coactosin-like protein at 1.9 Å resolution.** *Protein Sci*, v.13, n.11, Nov, p.2845-51. 2004.

Luscinskas FW and Lawler J. **Integrins as dynamic regulators of vascular function.** *FASEB J*, 8:929-938,1994.

Malik AR e Lo SK. **Vascular endothelia adhesion molecules and tissue inflammation.** *Pharmacol Ver.* 48:213-229,1996.

Manfred von Ardenne *Arbeiten zur Elektronik.* 1937 Deutsch, 2001.

Martin J Y. **Effect of titanium surface roughness on proliferation of human osteoblast-like cells (MG-63).** *J Biomed Mater Res*, 29:389-401, 1995.

Matsuba KT, Van Eeden SF Bicknell SG, Walker BAM, Hayashi S e Hogg JS. **Apoptosis in circulating PMN: Increased susceptibility in L-selectin-deficient PMN.** *Am J Physiol*, 272: H2852-H2858,1997.

McEver RP e Cummings RD. **Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment.** *J Clin Invest*,100:485-492,1997.

McGill SN, Ahmed NA, Hu F, Michel RP e Christou NV. **Shedding of L-selectin as a mechanism for reduced polymorphonuclear neutrophil exudation in patients with the systemic inflammatory response syndrome.** *Arch Surg*, 131:1141-1147,1996.

McNally AK, Anderson JM. **Complement C3 participation in monocyte adhesion to different surfaces.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:10119-23, 1994.

Michishita M, Videm V and Arnaout MA. **A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta2 integrin CR-3 (CD-11b/CD-18) is essential for ligand binding.** *Cell*, 72:857-867, 1993.

Myers, S. A., Han, J. W., Lee, Y., Firtel, R. A., and Chung, C. Y. **A Dictyostelium homologue of WASP is required for polarized F-actin assembly during chemotaxis.** *Mol. Biol. Cell*, 16, 2191–2206. 2005.

Niggli, V. **Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways.** *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 35, 1619–1638. 2003.

Nusbacher J, Rosenfeld SI, MacPherson JL, Thiem PA, Leddy JP. **Nylon fiber leukapheresis: associated complement component changes and granulocytopenia.** *Blood*, 51:359-65, 1978.

Nygren H, Tengvall P, Lundstrom, I. **The inicial reactions of TiO<sub>2</sub> with blood.** *J Biomed Mat Res*, 43: 487- 492, 1997.

Orsello CE, Lauffenburger DA, Hammer DA. **Molecular properties in cell adhesion: a physical and engineering perspective.** Trends Biotechnol, 19(8):310-6, 2001.

Oxvig C and Springer TA. **Experimental support for a beta propeller domain in integrin alfa subunits and a calcium binding site on its lower surface.** Proc Natl Acad Sci USA, 95:4870-4875, 1998.

Prerna C. Patel\*, and Rene E. Harrison\*. **Membrane Ruffles Capture C3b-opsionized Particles in Activated Macrophages.** Molecular Biology of the Cell, 11: 4628-4639, 2008.

Rabb H, Michishita M, Sharma CP, Brown D and Arnaout MA. **Cytoplasmic tails of human complement receptors 3 (CR3, CD-11b/CD-18) regulate ligand avidity and the internalization of occupied receptors.** J Immunol 151:990-1002,1993.

Rainer TH. **L-selectin in health and disease.** Resuscitation, 52:127-41, 2002.

Ratner BD, **New ideas in biomaterials science – A Path to engineered biomaterials.** J.Biomed. Mater. Res, 27: 837-850, 1993.

Rosengren A, Johansson BR, Danielsen N, Thomsen P, Ericson LE. **Immunohistochemical studies on the distribution of albumin, "brinogen, "bronectin, IgG and collagen around PTFE and titanium implants.** Biomaterials, 17:1779 86, 1996.

S. Dawitt and M. Hallett. **Leukocyte membrane "expansion": a central mechanism for leukocyte extravasation.** J Leukoc Biol, 81:1160-1164, 2007.

Salzman EW, Lindon J, McManama G, Ware JA. **Role of fibrinogen in activation of platelets by artificial surfaces.** Ann N Y Acad Sci, 516:184-95, 1987.

Schleiffenbaum B, Spertini O e Tedder TF. **Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity.** J Cell Biol, 119:229-238,1992.

Scholz D, Devaux B, Hirche A, Potzasch B, Kropp B, Schaper W e Schaper J. **Expression of adhesion molecules is specific and time dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture.** Cell Tissue Res, 284:415-423, 1996.

Sengelov H. **Secretory vesicles on human neutrophils.** Eur J Haematol, 57(Suppl 58):6-24,1996.

Sheppard, F. R., M. R. Kelher, *et al.* **Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation.** J Leukoc Biol, v.78, n.5, Nov, p.1025-42. 2005.



- Siddiqui, R. A., D. English, *et al.* **Phorbol ester-induced priming of superoxide generation by phosphatidic acid-stimulated neutrophils and granule-free neutrophil cytoplasts.** J Leukoc Biol, v.58, n.2, Aug, p.189-95. 1995.
- Sitterberg J, Ozcetin A, Ehrhardt C, Bakowsky U. **Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems.** Eur J Pharm Biopharm, 74(1):2-13, 2010.
- Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, *et al.* **P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules.** J Exp Med, 197:1355-63, 2003.
- Spertini O, Luscinikas FW, Munro JM, Griffin JD, Gimbrone MA Jr e Tedder TF. **Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with na inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion.** J Immunol 147: 2565-2573, 1991.
- Springer TA. **Folding of the N –terminal, ligand- binding region of integrin alfa subunits into a beta propellor domain.** Bichemestry, 94:65-72,1997.
- Springer TA. **Traffic signals for leukocyte recirculation and leukocyte emigration: The multiatep paradigm.** Cell, 76: 301-314,1994.
- Stanley P and Hogg N. **The I domain of integrin LFA-1 interacts with ICAM-1 domain 1 at residues Glu-34 but not Gln-73.** J Biol Chem, 273:3358-3362,1998.
- Su, W. H., H. I. Chen, *et al.* **Endothelial [Ca(2+)](i) signaling during transmigration of polymorphonuclear leukocytes.** Blood, v.96, n.12, Dec 1, p.3816-22. 2000.
- Swain S.D. , R. T. T., and Quinn M.T. **Neutrophil Priming in Host Defense: Role of Oxidants as Priming Agents.** ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING, v.4,n.1, p.69-83. 2002.
- Tang L, Eaton JW. **Fibrinogen mediates acute inflammatory responses to biomaterials.** J Exp Med,178:2147-56, 1993.
- Tedder TF, Steeber DA, Chen A e Angel P. **The selectins: Vascular adhesion molecules.** FASEB J 9:866-873,1995a.
- Testori *et.al.*, **Immediate occlusal loading of osseotite implantes in the completely edentulous mandible.** Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 4:544-551.
- Theilgaard-Monch, K., B. T. Porse, *et al.* **Systems biology of neutrophil differentiation and immune response.** Curr Opin Immunol, v.18, n.1, Feb, p.54-60. 2006.
- Thomas KA, Cook SD. **An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition.** J Biomed Mater Res, 19:875-901, 1985.

Todd RF, 3rd. **The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3).** J Clin Invest, 98:1-2, 1996.

Varki A. **Selectin ligands: Will the ones please stand up?** J Clin Invest, 99:158-162,1997.

Von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE e Butcher EC. **Two- step modelo f leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta2 integrins in vivo.** Proc Natl Aca Sci USA 88:7538 75-42, 1991.

Vulcano, M., M. F. Alves Rosa, *et al.* **N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) inhibits tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human neutrophils.** Clin Exp Immunol, v.113, n.1, p.39-47. 1998.

Wagner JG, Roth RA. **Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature.** Pharmacol Ver, 52:349-74, 2000.

Walchek B and Jutila MA. **Bovine gama/Omega T-cells bind E-selectin via a novel glycoprotein receptor: First characterization of a lymphocyte/E-selectin interaction in na animal model.** J Exp Med,178:853-863, 1993.

Walchek B, Kahn J, Fisher JM, Wang BB, Fisk RS, Payan DG, Fehan C, Betagari R, Darlak K, Spatola AF e Kishimoto TK. **Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro.** Nature, 380:720-723,1996.

Weiner, O. D., Marganski, W. A., Wu, L. F., Altschuler, S. J., and Kirschner, M. W. **An actin-based wave generator organizes cell motility.** PLoS Biol 5, e221. 2007.

Willians MA and Solomkin JS. **Integrin mediated signaling in human neutrophil functioning.** J Leukoc Biol, 65:725-736,1999.

Willmroth F and Beaud *et al.* **Struture of the murine E-selectin ligand (ESL-1) gene and assignment to chromossome 8.** Mann Genome, 10:1085-1088,1998.