

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/09/2020.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



José Francisco Santos Simões da Rocha

**Efeito do processo de envelhecimento sobre propriedades físicas e biológicas
de biomateriais utilizados como *abutments***

Araraquara

2018



**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



José Francisco Santos Simões da Rocha

**Efeito do processo de envelhecimento sobre propriedades físicas e biológicas
de biomateriais utilizados como *abutments***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral, Área de Concentração – Prótese.

Orientadora: Prof^a Dr^a Janaina Habib Jorge

Araraquara

2018

Rocha, José Francisco Santos Simões da
Efeito do processo de envelhecimento sobre propriedades físicas e biológicas de biomateriais utilizados como abutments / José Francisco Santos Simões da Rocha. -- Araraquara: [s.n.], 2018
67 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Janaína Habib Jorge

1. Próteses e implantes 2. Propriedades físicas
3. Biofilmes 4. Técnicas de cultura de células I. Título

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

José Francisco Santos Simões da Rocha

**Efeito do processo de envelhecimento sobre propriedades físicas e biológicas
de biomateriais utilizados como *abutments***

COMISSÃO JULGADORA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
REABILITAÇÃO ORAL**

Presidente e Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaina Habib Jorge

2º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Vanessa Migliorini Urban

Araraquara, 10 de setembro de 2018

DADOS CURRICULARES

José Francisco Santos Simões da Rocha

Nascimento: 24 de julho de 1987

Filiação: Pai: Francisco Simões da Rocha

Mãe: Sandra Regina dos Santos Rocha

2006-2010: Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2013-2015: Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Implantodontia.

2016 a 2017: Estágio Docência nas Disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico este trabalho a Deus,
que nos ensina o caminho da partilha
compartilhando conosco a Vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e por sempre colocar pessoas boas ao meu lado.

Aos meus pais, Francisco e Sandra, que sempre me amaram e se preocuparam muito com a minha educação, apesar da difícil condição financeira.

Aos meus irmãos, Mateus e Lucas, pelo companheirismo e amizade que sempre tivemos. Sinto-me grato por ter duas pessoas tão íntegras e “do bem” como irmãos.

À minha namorada, Debora, por ter tornado minha vida muito mais bonita! Agradeço por ter uma pessoa tão linda e amorosa caminhando ao meu lado. Também sou grato por todo seu companheirismo, apoio e paciência durante esse período de mestrado.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Janaína Habib Jorge, por sua orientação, paciência, compreensão e ajuda neste trabalho.

Aos professores da minha banca, Prof. Dr. Gelson Luis Adabo e Prof^a. Dr^a. Vanessa Migliorini Urban, pela disponibilidade e contribuição para melhoria deste trabalho. Também sou grato ao Prof. Gelson pela solicitude e gentileza em todos os momentos que precisei de sua ajuda, incluindo para o uso do Laboratório do Departamento de Materiais Dentários e Prótese.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Júnior, pela parceria na pesquisa e ajuda para obtenção de materiais. Também sou grato pela sua contribuição como professor membro da banca de qualificação desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Marlise Inês Klein, pela sua contribuição para a qualificação desse trabalho e pelo seu exemplo de professora pesquisadora comprometida com a Ciência e com o bem-estar da sociedade. Levarei sempre comigo seu exemplo de cientista.

À Prof^a. Dr^a. Maria Silvia Maurício Rigolin, pela orientação e solicitude em todos os momentos que precisei. Também sou grato pela parceria nos experimentos e pela boa energia que me transmitiu.

À Prof^a. Dr^a. Paula Aboud Barbugli, por compartilhar seus conhecimentos de forma tão gentil. Agradeço por todo apoio dado para realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Danny Omar Mendoza Marin, pela ajuda na interpretação dos resultados.

À Prof^a. Dr^a. Érica Dorigatti D'Ávila, pela ajuda na realização desse trabalho.

Aos colegas Maria Isabel, Jacqueline, Vinicius e Camila Foggi pelos ensinamentos técnicos de laboratório e pela boa convivência.

À Lígia, pelo apoio técnico e pela amizade.

Ao Prof. João Victor Schiavon, pela gentileza de me permitir usar o laboratório da Faculdade de Química de Araraquara (UNESP).

À Conexão Sistemas de Próteses Ltda., pela doação dos corpos de prova utilizados nesta pesquisa.

Ao Ministério da Educação e à CAPES, por terem me dado apoio financeiro durante o período de mestrado.

Enfim, agradeço a todos os professores, colegas, técnicos, funcionários e entidades que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“Quando o mundo estiver unido na busca do conhecimento, e não mais lutando por dinheiro e poder, então nossa sociedade poderá enfim evoluir a um novo nível.”

Le Livros

Rocha JFSS. Efeito do processo de envelhecimento sobre propriedades físicas e biológicas de biomateriais utilizados como *abutments* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2018.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do envelhecimento de materiais comumente usados como pilares de próteses implanto-suportadas (*abutments*) sobre suas características físicas de superfície (rugosidade, energia livre de superfície e molhabilidade) e propriedades biológicas (metabolismo de fibroblastos orais e formação de biofilme fúngico). Para isso, discos (N=62) com rugosidade inferior a 0,2 µm foram confeccionados em zircônia (ZrO₂) do tipo Y-TZP (yttrium-stabilized tetragonal zirconia polycrystalline) e em titânio (Ti) comercialmente puro, e foram submetidos a um processo de envelhecimento simulado em autoclave a 134°C (pressão de 2 bar) por 20 horas. ZrO₂ e Ti envelhecidos foram comparados aos seus homólogos não envelhecidos. Os materiais também foram comparados entre si, nas condições envelhecida e não envelhecida. Para os testes biológicos, os grupos também foram comparados a um controle positivo de poliestireno. Todos os testes, exceto o de rugosidade, foram realizados após a formação de película salivar sobre os discos. Os testes biológicos utilizados foram de Alamar Blue (n=9) para avaliar o metabolismo de fibroblastos da gengiva humana (FGH) e de contagem de colônias viáveis (n=9) para verificar a formação de biofilme de uma cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC90028) sobre os materiais. Além disso, microscopia eletrônica de varredura (MEV) (n=2) foi realizada para avaliação da morfologia dos fibroblastos e dos microrganismos. Para a análise estatística, foram utilizados os testes paramétricos *t*-teste para amostras pareadas para a rugosidade, *t*-teste para amostras independentes para energia livre de superfície, molhabilidade e metabolismo dos fibroblastos, e ANOVA *one-way* com correção de Welch e teste post-hoc de Games-Howell para contagem de colônias viáveis. Utilizou-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$ para todas as análises de inferência. Os resultados mostraram que o processo de envelhecimento não alterou a rugosidade dos materiais testados (ZrO₂ e Ti), mas aumentou a energia livre de superfície e a molhabilidade de ambos. Além disso, o envelhecimento não teve efeito sobre o metabolismo dos fibroblastos FGH nem alterou a quantidade de colônias viáveis dos biofilmes de *Candida albicans* cultivados sobre os discos de ZrO₂ ou Ti. Quando os materiais foram comparados entre si, a ZrO₂ apresentou menores valores de rugosidade em comparação ao Ti. Além disso, a ZrO₂ apresentou maior energia livre de superfície e maior molhabilidade. Para os testes biológicos, não houve alteração do metabolismo de fibroblastos FGH entre os materiais, porém ocorreu menor crescimento de *Candida albicans* sobre a ZrO₂. A análise das imagens de MEV confirmou os resultados encontrados nos testes biológicos. Concluiu-se que o processo de envelhecimento simulado em autoclave não influenciou o crescimento de fibroblastos FGH ou de *Candida albicans* sobre ZrO₂ ou Ti, mas a ZrO₂ apresentou menor formação de biofilme fúngico em comparação com o Ti.

Palavras-chave: Próteses e implantes. Propriedades físicas. Biofilmes. Técnicas de cultura de células.

Rocha JFSS. Effect of the aging process on physical and biological properties of biomaterials used as *abutments* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of aging of commonly used abutments on their surface physical characteristics (roughness, surface free energy and wettability) and biological properties (oral fibroblasts metabolism and formation of fungal biofilm). For this purpose, discs (N=62) with roughness less than 0.2 μm were made in yttrium-stabilized tetragonal zirconia polycrystalline (Y-TZP) zirconia (ZrO_2) and in commercially pure titanium (Ti), and underwent a simulated aging process in autoclave at 134 °C (pressure of 2 bar) for 20 hours. ZrO_2 and Ti were compared to their unaged counterparts. The materials were also compared to each other in the aged and unaged conditions. For the biological tests, the groups were also compared to a positive control of polystyrene. All tests, except roughness, were performed after the formation of salivary film on the discs. The biological tests used were Alamar Blue (n=9) to evaluate the metabolism of human gingival fibroblasts (HGF) and colony counting test (n=9) to verify the biofilm formation of a reference strain of *Candida albicans* (ATCC90028) on the materials. In addition, scanning electron microscopy (SEM) (n=2) was performed to evaluate the morphology of fibroblasts and microorganisms. For statistical analysis, the t-test for paired samples was used for roughness, t-test for independent samples was used for surface free energy, wettability and fibroblasts metabolism, and one-way ANOVA with Welch correction and Games-Howell post-hoc test was used for colony counting test. A significance level of $\alpha = 0.05$ was used for all inference analyzes. The results showed that the aging process did not alter the roughness of the tested materials (ZrO_2 and Ti), but it increased their surface free energy and wettability. In addition, aging had no effect on the metabolism of HGF fibroblasts nor did it change the amount of viable colonies of *Candida albicans* biofilms cultured on ZrO_2 or Ti discs. When the materials were compared to each other, ZrO_2 presented lower roughness values in comparison to Ti. In addition, ZrO_2 presented higher surface free energy and wettability. For the biological tests, there was no alteration in the metabolism of HGF fibroblasts between the materials, but there was a lower growth of *Candida albicans* on ZrO_2 . SEM analysis confirmed the results found in the biological tests. It was concluded that the autoclave aging process did not influence the growth of HGF fibroblasts or *Candida albicans* on ZrO_2 or Ti, but ZrO_2 presented less fungal biofilm formation compared to Ti.

Keywords: Prostheses and implants. Biofilms. Cell culture techniques. Physical properties.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Materiais Testados	31
4.2 Grupos Experimentais	31
4.3 Delineamento do Estudo	31
4.4 Limpeza dos Corpos de Prova	32
4.5 Envelhecimento dos Corpos de Prova	32
4.6 Coleta de Saliva para Formação de Película Salivar	33
4.7 Propriedades Físicas	33
4.7.1 Rugosidade superficial média (Ra).....	33
4.7.2 Energia livre de superfície (ELS)	34
4.7.3 Molhabilidade	35
4.8 Propriedades Biológicas	35
4.8.1 Esterilização dos corpos de prova	35
4.8.2 Metabolismo de fibroblastos gengivais cultivados sobre as amostras de Ti e ZrO ₂	35
4.8.3 Formação de biofilme de <i>Candida albicans</i> sobre as amostras de Ti e ZrO ₂	36
4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
4.10 Análise Estatística.....	38
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Propriedades Físicas	40
5.1.1 Rugosidade superficial média (Ra).....	40
5.1.2 Energia livre de superfície (ELS)	41
5.1.3 Molhabilidade	43
5.2 Propriedades Biológicas	44
5.2.1 Metabolismo de fibroblastos gengivais cultivados sobre as amostras de Ti e ZrO ₂	44
5.2.2 Formação de biofilme de <i>Candida albicans</i> sobre as amostras de Ti e ZrO ₂	45
5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO A.....	64

1 INTRODUÇÃO

O implante dentário tem sido uma importante ferramenta para a substituição de dentes perdidos. Sua indicação vai desde casos com grande demanda estética, como a substituição de um único elemento anterior, até casos com grande demanda funcional, atuando na retenção de próteses totais fixas ou removíveis. Nos casos de reabilitação fixa, pilares intermediários (*abutments*) são parafusados sobre os implantes para fixação da prótese. Esses pilares geralmente são confeccionados com material metálico e/ou cerâmico, ambos apresentando adequada biocompatibilidade¹.

Para que o implante se mantenha em função ao longo do tempo, é fundamental que alguns fatores sejam observados, entre eles, a presença de um bom selamento promovido pelo tecido gengival junto à superfície do pilar². Esse selamento evita a infiltração de microrganismos, prevenindo o aparecimento de inflamação na gengiva (mucosite) e no osso (peri-implantite)³. Assim, é desejável que as superfícies dos *abutments* favoreçam a adesão de células para formação do epitélio juncional, responsável pelo selamento biológico, e que essas superfícies tenham características que dificultem a colonização por microrganismos, evitando a ocorrência de doenças peri-implantares.

As doenças peri-implantares envolvem diversos microrganismos, com predomínio de bactérias anaeróbias Gram-negativas⁴. Dentre os microrganismos presentes na peri-implantite, pode-se destacar as chamadas bactérias do “complexo vermelho”, *Porphyromonas gingivalis*⁵⁻¹¹, *Treponema denticola*^{7-9,11,12} e *Tannerella forsythia*^{6,8,9,11,12}. Também são encontradas bactérias do gênero *Prevotella spp.*^{5,13,14} principalmente as espécies *Prevotella intermedia*^{6,7,9,12} e *Prevotella nigrescens*^{6,8,12}. Além dessas, bactérias dos gêneros *Streptococcus spp.*^{5,6,8,14,15}, *Staphylococcus spp.*^{9,12,14} e *Fusobacterium spp.*^{13,15}, como a espécie *Fusobacterium nucleatum*^{12,5,6,8}, são frequentemente associadas à peri-implantite. Microrganismos oportunistas como a *Candida spp.*^{6,12,16-18} também podem estar presentes.

Candida albicans é o fungo mais prevalente na cavidade oral, e sua ocorrência está associada com estomatite protética¹⁹. Próteses totais removíveis retidas por implantes (*overdentures*) podem ser removidas para a higienização, ao contrário dos implantes e *abutments* que permanecem in situ, favorecendo a infecção por espécies fúngicas. *Candida albicans* tem sido relatada como uma

espécie oportunista nas lesões peri-implantares^{17,18} e a formação de biofilmes nessas superfícies pode acarretar em infecções com subsequente morbidade, uma vez que os biofilmes fúngicos são difíceis de tratar devido à sua maior resistência a agentes antimicrobianos.

Por essa razão, as infecções fúngicas associadas ao uso de próteses sobre implantes podem levar à remoção dos materiais implantados e consequente perda da prótese. A superfície do *abutment* pode fornecer o substrato necessário para a formação de biofilmes fúngicos e, portanto, pode ser considerada um potencial reservatório para infecção por *Candida albicans*²⁰. Adicionalmente, alguns estudos^{20,21} enfatizam a relevância da película salivar e seus constituintes no processo de adesão fúngica inicial. De acordo com Bürgers et al.²⁰, a mucina pode servir como um receptor para a adesão de *Candida albicans*, enquanto que a albumina pode atuar como agente bloqueador no complexo processo de adesão. Além disso, os materiais com diferentes composições e propriedades hidrofóbicas apresentam diversas maneiras de absorção de mucina salivar, adesão inicial e posterior formação de biofilme²¹. Normalmente, a película salivar sobre os biomateriais aumenta a energia livre de superfície, reduzindo o número de células aderidas^{22,23}. Devido à capacidade de adesão dos microrganismos nas superfícies de *abutments*²⁴, a barreira formada pelo tecido gengival ao redor dos mesmos deve ser efetiva para que não ocorra a perda precoce do implante por deficiência no processo de osseointegração. Além disso, essa barreira deve permanecer com esta efetividade ao longo do tempo mesmo com a renovação celular e envelhecimento dos biomateriais, para que não haja a perda tardia, como resultado de doença peri-implantar.

A adesão de microrganismos e de células epiteliais aos biomateriais envolve uma série de fatores, entre os quais as características da superfície desses materiais, como energia livre, molhabilidade e rugosidade^{22,23,25-35}. Energia livre é uma característica de superfície relacionada à diferença que existe na força de atração entre as moléculas que estão no interior de uma substância e as moléculas que estão na superfície. As moléculas da superfície realizam menor número de interações, o que faz com que possuam maior energia média em relação às moléculas do interior do líquido. Uma das formas de medir a energia livre de uma superfície é através do ângulo de contato formado por gotas de líquidos depositadas sobre a mesma. Molhamento é a capacidade de um líquido se espalhar por uma

superfície. O molhamento completo da superfície ocorre quando as forças de adesão são superiores às forças de coesão. Forças de adesão são aquelas que fazem com que partículas de um material atraiam partículas de outros materiais, enquanto que forças de coesão são aquelas que fazem com que as partículas de um mesmo material permaneçam unidas. Rugosidade é o conjunto das irregularidades microgeométricas presentes em uma superfície, e pode ser medida através de um aparelho chamado rugosímetro.

Ao longo do tempo, os materiais protéticos podem ter suas propriedades físicas alteradas quando expostos na cavidade oral em função da umidade, acidez, temperatura e cargas mecânicas da mastigação³⁶. Assim, o processo de envelhecimento ocorre naturalmente e pode acarretar em alterações nas propriedades superficiais dos biomateriais, tais como: rugosidade superficial, hidrofobicidade e energia livre de superfície³⁶. Alguns estudos simulam o envelhecimento de materiais através de técnicas como a ciclagem mecânica ou a ciclagem hidrotérmica³⁷⁻⁴².

O presente estudo consistiu na investigação da influência do envelhecimento por ciclagem hidrotérmica de materiais usados como pilares de próteses implanto-suportadas (zircônia e titânio) sobre as propriedades físicas (rugosidade, energia livre de superfície e molhabilidade) desses materiais, assim como sobre as propriedades biológicas de adesão, morfologia e metabolismo de células humanas e capacidade de formação de biofilme de *Candida albicans*. A literatura apresenta poucos estudos avaliando a adesão de diferentes células às superfícies protéticas submetidas ao envelhecimento, especialmente após a formação de película salivar. Assim, a relação entre o processo de envelhecimento, características superficiais de biomateriais e propriedades biológicas de células gengivais e fúngicas ainda permanece controversa, justificando a importância do presente estudo.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e considerando as limitações do presente estudo, foi possível concluir que o processo de envelhecimento simulado em autoclave:

1. Não alterou a rugosidade dos materiais avaliados (zircônia e titânio). Porém, a zircônia apresentou menores valores em relação ao titânio;

2. Aumentou a energia livre de superfície e reduziu o ângulo de contato com a água para ambos os materiais. A zircônia apresentou maiores valores de energia livre de superfície e menores valores de ângulo de contato em comparação com o titânio;

3. Não teve efeito sobre o metabolismo de fibroblastos da gengiva humana (FGH). O tipo de material (zircônia ou titânio) também não influenciou esse fator de estudo. Além disso, imagens de microscopia mostraram que a adesão e a morfologia das células não foram alteradas pelo envelhecimento nem pelo tipo de material;

4. Não alterou a quantidade de colônias viáveis de biofilmes de *Candida albicans* sobre zircônia ou titânio. Porém, a zircônia apresentou valores menores de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) em relação ao titânio. As imagens de microscopia também confirmaram esses resultados.

REFERÊNCIAS*

1. Abrahamsson I, Berglundh T, Glantz PO, Lindhe J. The mucosal attachment at different abutments. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(9): 721-27.
2. Humphrey S. Implant maintenance. *Dent Clin North Am*. 2006; 50(3): 463-78.
3. Kawahara H, Kawahara D, Mimura Y, Takashima Y, Ong JL. Morphologic studies on the biologic seal of titanium dental implants. Report II. In vivo study on the defending mechanism of epithelial adhesion/attachment against invasive factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13(4): 465-73
4. Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Ohkuma M, Izumi Y. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *J Oral Microbiol*. 2010; 2(1): 5104.
5. Jakobi ML, Stumpp SN, Stiesch M, Eberhard J, Heuer W. The peri-implant and periodontal microbiota in patients with and without clinical signs of inflammation. *Dent J (Basel)*. 2015; 3(2): 24-42.
6. Rams TE, Degener JE, Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human peri - implantitis microbiota. *Clin Oral Implants Res*. 2014; 25(1): 82-90.
7. Hultin M, Gustafsson A, Hallström H, Johansson LA, Ekfeldt A, Klinge B. Microbiological findings and host response in patients with peri - implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2002; 13(4): 349-58.
8. Maruyama N, Maruyama F, Takeuchi Y, Aikawa C, Izumi Y, Nakagawa I. Intraindividual variation in core microbiota in periimplantitis and periodontitis. *Sci Rep*. 2014; 4: 6602.
9. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri - implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014; 16(6): 783-93.
10. Galassi F, Kaman WE, Anssari Moin D, Van Der Horst J, Wismeijer D, Crielaard W et al. Comparing culture, real - time PCR and fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Porphyromonas gingivalis* in patients with or without peri - implant infections. *J Periodont Res*. 2012; 47(5): 616-25.
11. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra - and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(10): 975-82.
12. Charalampakis G, Leonhardt A, Rabe P, Dahlén G. Clinical and microbiological characteristics of peri - implantitis cases a retrospective multicentre study. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(9): 1045-54.

* De acordo com as normas do termo de qualificação de mestrado da FOAR/UNESP, baseado nas normas Vancouver. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

13. Al-Radha ASD, Pal A, Pettemerides AP, Jenkinson HF. Molecular analysis of microbiota associated with peri-implant diseases. *J Dent*. 2012; 40(11): 989-98.
14. Dabdoub SM, Tsigarida AA, Kumar PS. Patient-specific analysis of periodontal and peri-implant microbiomes. *J Dent Res*. 2013; 92: 168S–75S.
15. Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Maruyama N, Ohkuma M, Izumi Y. Comprehensive microbiological findings in periimplantitis and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2013; 40: 218–26.
16. Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res*. 1999; 10(5): 339-45.
17. Leonhardt A, Bergström C, Lekholm U. Microbiologic diagnostics at titanium implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003; 5(4): 226-32.
18. Shibli JA, Martins MC, Lotufo RFM, Marcantonio Junior E. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003; 18(3): 383-90.
19. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(3): 359-83.
20. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater*. 2010; 6(6): 2307-13.
21. Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *J Dent*. 2012; 40(8): 686-92.
22. Custodio W, Silva WJ, Paes Leme AF, Cury JA, Del Bel Cury AA. Plasma proteins in the acquired denture pellicle enhance substrate surface free energy and *Candida albicans* phospholipase and proteinase activities. *J Investig Clin Dent*. 2015; 6(4): 273-81.
23. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. *Arch Oral Biol*. 2010; 55(10): 763-70.
24. Größner - Schreiber B, Teichmann J, Hannig M, Dörfer C, Wenderoth DF, Ott SJ. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(8): 817- 26.
25. Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*. 2004; 8(3): 37-57.
26. Quirynen M, Van der Mei HC, Bollen CML, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra-and subgingival plaque. *J Dent Res*. 1993; 72(9): 1304-09.

27. Baharloo B, Textor M, Brunette DM. Substratum roughness alters the growth, area, and focal adhesions of epithelial cells, and their proximity to titanium surfaces. *J Biomed Mater Res. Part A.* 2005; 74(1): 12-22.
28. Kloss FR, Steinmüller-Nethl D, Stigler RG, Ennemoser T, Rasse M, Hächl O. In vivo investigation on connective tissue healing to polished surfaces with different surface wettability. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22(7): 699-705.
29. Hormia M, Könönen M, Kivilahti J, Virtanen I. Immunolocalization of proteins specific for adherens junctions in human gingival epithelial cells grown on differently processed titanium surfaces. *J Periodontol Res.* 1991; 26(6): 491-97.
30. Carmine MD, Toto P, Feliciani C, Scarano A, Tulli A, Strocchi R et al. Spreading of epithelial cells on machined and sandblasted titanium surfaces: an in vitro study. *J Periodontol.* 2003; 74(3): 289-95.
31. Roach P, Farrar D, Perry CC. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *J Am Chem Soc.* 2005; 127(22): 8168-73.
32. Rompen E, Domken O, Degidi M, Farias Pontes AE, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17(S2): 55-67.
33. Dorkhan M, de Paz LEC, Skepö M, Svensäter G, Davies JR. Effects of saliva or serum coating on adherence of *Streptococcus oralis* strains to titanium. *Microbiology.* 2012; 158(2): 390-97.
34. Silva WJ, Leal CM, Viu FC, Gonçalves LM, Barbosa CM, Del Bel Cury AA. Influence of surface free energy of denture base and liner materials on *Candida albicans* biofilms. *J Investig Clin Dent.* 2015; 6(2): 141-46.
35. Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mater Sci Eng C.* 2003; 23(4): 551-60.
36. Luo H, Tang X, Dong Z, Tang H, Nakamura T, Yatani H. The influences of accelerated aging on mechanical properties of veneering ceramics used for zirconia restorations. *Dent Mater J.* 2016; 35(2): 187-93.
37. Kohorst P, Dittmer MP, Borchers L, Stiesch-Scholz M. Influence of cyclic fatigue in water on the load-bearing capacity of dental bridges made of zirconia. *Acta Biomater.* 2008; 4(5): 1440-47.
38. Lohbauer U, Krämer N, Petschelt A, Frankenberger R. Correlation of in vitro fatigue data and in vivo clinical performance of a glassceramic material. *Dent Mater.* 2008; 24(1): 39-44.
39. Wiskott HW, Nicholls JI, Belser UC. Stress fatigue: basic principles and prosthodontic implications. *Int J Prosthodont.* 1995; 8(2): 105-16.

40. Borchers L, Stiesch M, Bach FW, Buhl JC, Hübsch C, Kellner T et al. Influence of hydrothermal and mechanical conditions on the strength of zirconia. *Acta Biomater.* 2010; 6(12): 4547-52.
41. Chevalier J, Gremillard L, Deville S. Low-temperature degradation of zirconia and implications for biomedical implants. *Annu Rev Mater Res.* 2007; 37: 1-32.
42. Lucas TJ, Lawson NC, Janowski GM, Burgess JO. Phase transformation of dental zirconia following artificial aging. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015; 103(7): 1519-23.
43. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol.* 2004; 75(2): 292-6.
44. Degidi M, Artese L, Scarano A, Perrotti V, Gehrke P, Piattelli A. Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol.* 2006; 77(1): 73-80.
45. Al-Marzouk MI, Al-Azzawi HJ. The effect of the surface roughness of porcelain on the adhesion of oral *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract.* 2009; 10(6): 17-24.
46. van Brakel R, Cune MS, van Winkelhoff AJ, de Putter C, Verhoeven JW, van der Reijden W. Early bacterial colonization and soft tissue health around zirconia and titanium abutments: an in vivo study in man. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22(6): 571-77.
47. Al-Radha ASD, Dymock D, Younes C, O'Sullivan D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J Dent.* 2012; 40(2): 146-53.
48. Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Fackler A, Follo M, Hellwig E, Bächle M et al. In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(9): 1139-47.
49. Moon YH, Yoon MK, Moon JS, Kang JH, Kim SH, Yang HS et al. Focal adhesion linker proteins expression of fibroblast related to adhesion in response to different transmucosal abutment surfaces. *J Adv Prosthodont.* 2013; 5(3): 341-50.
50. de Avila ED, de Molon RS, Vergani CE, de Assis Mollo Junior F, Salih V. The relationship between Biofilm and physical-chemical properties of implant abutment materials for successful dental implants. *Materials (Basel).* 2014; 7(5): 3651-62.
51. Kim YS, Shin SY, Moon SK, Yang SM. Surface properties correlated with the human gingival fibroblasts attachment on various materials for implant abutments: a multiple regression analysis. *Acta Odontol Scand.* 2015; 73(1): 38-47.
52. Liu M, Zhou J, Yang Y, Zheng M, Yang J, Tan J. Surface modification of zirconia with polydopamine to enhance fibroblast response and decrease bacterial activity in vitro: a potential technique for soft tissue engineering applications. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015; 136: 74-83.

53. Rutkunas V, Bukelskiene V, Sabaliauskas V, Balciunas E, Malinauskas M, Baltriukiene D. Assessment of human gingival fibroblast interaction with dental implant abutment materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 26(169): 1-9.
54. Brunot-Gohin C, Duval JL, Verbeke S, Belanger K, Pezron I, Kugel G et al. Biocompatibility study of lithium disilicate and zirconium oxide ceramics for esthetic dental abutments. *J Periodontal Implant Sci*. 2016; 46(6): 362-71.
55. de Avila ED, Avila-Campos MJ, Vergani CE, Spolidório DM, de Assis Mollo Junior F. Structural and quantitative analysis of a mature anaerobic biofilm on different implant abutment surfaces. *J Prosthet Dent*. 2016; 115(4): 428-36.
56. Okabe E, Ishihara Y, Kikuchi T, Izawa A, Kobayashi S, Goto H. Adhesion properties of human oral epithelial-derived cells to zirconia. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016; 18(5): 906-16.
57. Mehl C, Kern M, Schütte AM, Kadem LF, Selhuber-Unkel C. Adhesion of living cells to abutment materials, dentin, and adhesive luting cement with different surface qualities. *Dent Mater*. 2016; 32(12): 1524-35.
58. Pereira GKR, Muller C, Wandscher VF, Rippe MP, Kleverlaan CJ, Valandro LF. Comparison of different low-temperature aging protocols: its effects on the mechanical behavior of Y-TZP ceramics. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016; 60: 324-30.
59. de Avila ED, Vergani CE, de Assis Mollo Junior F, Junior MJ, Shi W, Lux R. Effect of titanium and zirconia dental implant abutments on a cultivable polymicrobial saliva community. *J Prosthet Dent*. 2017; 118(4): 481-87.
60. Dutra DAM, Pereira GKR, Kantorski KZ, Exterkate RAM, Kleverlaan CJ, Valandro LF et al. Grinding with diamond burs and hydrothermal aging of a y-tzp material: effect on the material surface characteristics and bacterial adhesion. *Oper Dent*. 2017; 42(6): 669-78.
61. Fischer NG, Wong J, Baruth A, Cerutis DR. Effect of clinically relevant CAD/CAM zirconia polishing on gingival fibroblast proliferation and focal adhesions. *Materials (Basel)*. 2017; 10(1358): 1-16.
62. Harlos MM, Bezerra da Silva T, Peruzzo DC, Napimoga MH, Joly In vitro microbiological analysis of bacterial seal in hybrid zirconia abutment tapered connection. *JC, Martinez EF. Implant Dent*. 2017; 26(2): 245-49.
63. Huacho PMM, Nogueira MNM, Basso FG, Jafelicci Junior M, Francisconi RS, Spolidorio DMP. Analyses of biofilm on implant abutment surfaces coating with diamond-like carbon and biocompatibility. *Braz Dent J*. 2017; 28(3): 317-23.
64. Mehl C, Kern M, Zimmermann A, Harder S, Huth S, Selhuber-Unkel C. Impact of cleaning procedures on adhesion of living cells to three abutment materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017; 32(5): 976-84.

65. Rigolin MSM, de Avila ED, Basso FG, Hebling J, de S Costa CA, de Assis Mollo Junior F. Effect of different implant abutment surfaces on OBA-09 epithelial cell adhesion. *Microsc Res Tech.* 2017; 80(12): 1304-09.
66. Dal Piva A, Contreras L, Ribeiro FC, Anami LC, Camargo S, Jorge A et al. Monolithic ceramics: effect of finishing techniques on surface properties, bacterial adhesion and cell viability. *Oper Dent.* 2018; 43(3): 315-25.
67. Gökmenoglu C, Kara NB, Beldüz M, Kamburoğlu A, Tosun I, Sadik E et al. Evaluation of *Candida albicans* biofilm formation on various parts of implant material surfaces. *Niger J Clin Pract.* 2018; 21(1): 33-37.
68. Kihara H, Kim DM, Nagai M, Nojiri T, Nagai S, Chen CY et al. Epithelial cell adhesion efficacy of a novel peptide identified by panning on a smooth titanium surface. *Int J Oral Sci.* 2018; 10(3): 21.
69. Lima EMCX, Koo H, Vacca Smith AM, Rosalen PL, Del Bel Cury AA. Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19(8): 780-85.
70. Mustafa K, Wennerberg A, Arvidson K, Messelt EB, Haag P, Karlsson S. Influence of modifying and veneering the surface of ceramic abutments on cellular attachment and proliferation. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19(11): 1178-87.
71. Park JH, Olivares-Navarrete R, Baier RE, Meyer AE, Tannenbaum R, Boyan BD et al. Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. *Acta Biomater.* 2012; 8(5): 1966-75.
72. International Organization for Standardization. ISO 13356: implants for surgery: ceramic materials based on yttria-stabilized tetragonal zirconia (Y-TZP). 2nd. ed. Geneva: ISO; 2008.
73. Chevalier J, Cales B, Drouin JM. Low - temperature aging of Y - TZP ceramics. *J Am Ceram Soc.* 1999; 82(8): 2150-54.
74. Pereira GKR, Amaral M, Cesar PF, Bottino MC, Kleverlaan CJ, Valandro LF. Effect of low-temperature aging on the mechanical behavior of ground Y-TZP. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015; 45: 183-92.
75. de Almeida Basílio M, Cardoso KV, Antonio SG, Rizkalla AS, Santos Junior GC, Arioli Filho JN. Effects of artificial aging conditions on yttria-stabilized zirconia implant abutments. *J Prosthet Dent.* 2016; 116(2): 277-85.
76. Deville S, Gremillard L, Chevalier J, Fantozzi G. A critical comparison of methods for the determination of the aging sensitivity in biomedical grade yttria - stabilized zirconia. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 72(2): 239-45.
77. Teng FY, Ko CL, Kuo HN, Hu JJ, Lin JH, Lou CW et al. A comparison of epithelial cells, fibroblasts, and osteoblasts in dental implant titanium topographies. *Bioinorg Chem Appl.* 2012; 2012: 1-9.

78. Janssen D, de Palma R, Verlaak S, Heremans P, Dehaen W. Static solvent contact angle measurements, surface free energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicon dioxide. *Thin Solid Films*. 2006; 515(4): 1433-38.
79. Owens DK, Wendt RC. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci*. 1969; 13(8): 1741-47.
80. Panariello B, Alves F, Carmello JC. Padronização de curva de crescimento de *C. albicans* ATCC 90028. In: Paniarello B, Alves F, Carmello JC. Manual de protocolos do laboratório de microbiologia aplicada. Araraquara: Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014. p. 19-20.
81. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel EC, Cruz NC. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. *Mycoses*. 2011; 54(5): 344-51.
82. de Avila ED, de Molon RS, Lima BP, Lux R, Shi W, Jafelicci Junior M et al. Impact of physical chemical characteristics of abutment implant surfaces on bacteria adhesion. *J Oral Implantol*. 2016; 42(2): 153-58.
83. de Avila ED, Lima BP, Sekiya T, Torii Y, Ogawa T, Shi W et al. Effect of UV-photofunctionalization on oral bacterial attachment and biofilm formation to titanium implant material. *Biomaterials*. 2015; 67: 84-92.
84. Choi SH, Jeong WS, Cha JY, Lee JH, Lee KJ, Yu HS et al. Overcoming the biological aging of titanium using a wet storage method after ultraviolet treatment. *Sci Rep*. 2017; 7(3833): 1-7.
85. Pereira GKR, Silvestri T, Camargo R, Rippe MP, Amaral M, Kleverlaan CJ et al. Mechanical behavior of a Y-TZP ceramic for monolithic restorations: effect of grinding and low-temperature aging. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016; 63: 70-7.
86. Hao Z, Ma Y, Liu W, Meng Y, Nakamura K, Shen J et al. Influence of low-temperature degradation on the wear characteristics of zirconia against polymer-infiltrated ceramic-network material. *J Prosthet Dent*. 2018.
87. Pereira GKR, Venturini AB, Silvestri T, Dapieve KS, Montagner AF, Soares FZM et al. Low-temperature degradation of Y-TZP ceramics: a systematic review and meta-analysis. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016; 55: 151-63.
88. Amaral M, Valandro LF, Bottino MA, Souza RO. Low-temperature degradation of a Y-TZP ceramic after surface treatments. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013; 101(8): 1387-92.
89. Cattani-Lorente M, Durual S, Amez-Droz M, Wiskott HW, Scherrer SS. Hydrothermal degradation of a 3Y-TZP translucent dental ceramic: a comparison of numerical predictions with experimental data after 2 years of aging. *Dent Mater*. 2016; 32(3): 394-402.
90. Lughì V, Sergo V. Low temperature degradation -aging- of zirconia: a critical review of the relevant aspects in dentistry. *Dent Mater*. 2010; 26(8): 807-20.

91. Hori N, Iwasa F, Tsukimura N, Sugita Y, Ueno T, Kojima N et al. Effects of UV photofunctionalization on the nanotopography enhanced initial bioactivity of titanium. *Acta Biomater.* 2011; 7(10): 3679-91.
92. Suzuki T, Hori N, Att W, Kubo K, Iwasa F, Ueno T et al. Ultraviolet treatment overcomes time-related degrading bioactivity of titanium. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15(12): 3679-88.
93. Pereira GKR, Silvestri T, Amaral M, Rippe MP, Kleverlaan CJ, Valandro LF. Fatigue limit of polycrystalline zirconium oxide ceramics: effect of grinding and low-temperature aging. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016; 61: 45-54.
94. Colvin RB. Fibrinogen-fibrin interactions with fibroblasts and macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408(1): 621-33.
95. Beaussart A, Alsteens D, El-Kirat-Chatel S, Lipke PN, Kucharikova S, Van Dijck P et al. Single-molecule imaging and functional analysis of Als adhesins and mannans during *Candida albicans* morphogenesis. *ACS nano.* 2012; 6(12): 10950-64.
96. Glee PM, Sundstrom P, Hazen KC. Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* in vivo. *Infect Immun.* 1995; 63(4): 1373-9.
97. Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; 11(2): 169-78.
98. Bollen CM, Papaioanno W, van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7(3): 201-11.
99. Atsuta I, Ayukawa Y, Kondo R, Oshiro W, Matsuura Y, Furuhashi A et al. Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. *J Prosthodont Res.* 2016; 60(1): 3-11.
100. Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol.* 2014; 41 (Suppl 15): S6-S22.
101. Yamashita D, Machigashira M, Miyamoto M, Takeuchi, H, Noguchi K, Izumi Y et al. Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia. *Dent Mater J.* 2009; 28(4): 461-70.
102. Wei J, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Liu B et al. Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 81(1): 66-75.
103. Oakley C, Brunette DM. Topographic compensation: guidance and directed locomotion of fibroblasts on grooved micromachined substrata in the absence of microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1995; 31(1): 45-58.
104. Meyle J, Gültig K, Brich M, Hämmerle H, Nisch W. Contact guidance of fibroblasts on biomaterial surfaces. *J Mater Sci: Mater Med.* 1994; 5(6-7): 463-66.