

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 15/12/2023.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Bárbara Araújo dos Reis

Comportamento de células MC3T3 e adesão bacteriana em liga β Ti-35Nb-7Zr-5Ta caracterizada com íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e PO_3^{4-}

Araraquara

2021



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Bárbara Araújo dos Reis

Comportamento de células MC3T3 e adesão bacteriana em liga β Ti-35Nb-7Zr-5Ta caracterizada com íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e PO_3^{4-}

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutora em Odontologia, na Área de Implantodontia.

Orientador: Dr. Luis Geraldo Vaz

Araraquara

2021

R375c Reis, Bárbara Araújo dos
Comportamento de células MC3T3 e adesão bacteriana em liga Ti-35Nb-7Zr- 5Ta caracterizada com íons Mg²⁺, Ca²⁺ e PO₃⁴⁻ / Bárbara Araújo dos Reis. -- Araraquara, 2021
69 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Luis Geraldo Vaz

1. Biofilmes. 2. Titânio. 3. Ligas. 4. Biologia celular. 5. Osseointegração. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Bárbara Araújo dos Reis

Comportamento de células MC3T3 e adesão bacteriana em liga β Ti-35Nb-7Zr-5Ta caracterizada com íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e PO_3^{4-}

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora em Odontologia

Presidente e orientador: Dr. Luis Geraldo Vaz

2º Examinador: Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior

3º Examinador: Prof. Dr. Cássio do Nascimento

4º Examinador: Prof. Dr. Rafael Silveira Faeda

Araraquara, 15 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES

Bárbara Araújo dos Reis

NASCIMENTO: 04/03/1994 – Goiandira – Goiás

FILIAÇÃO: Luís Antônio de Araújo e Rosair Maria dos Reis Araújo

- 2012 - 2015** Graduação em Odontologia.
Universidade de Ribeirão Preto
- 2015 - 2015** Aperfeiçoamento em Extensão em Implantodontia.
Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia,
FAEPO
- 2016 - 2016** Aperfeiçoamento em Cirurgia oral menor.
Associação Brasileira de Odontologia - Araraquara
- 2017 - 2017** Aperfeiçoamento em Odontologia Hospitalar.
Educação Continuada do Portal de Educação
- 2016 - 2018** Mestrado em Odontologia, área de Biociência, Biomateriais e
Ciências Forenses.
Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAr/UNESP
- 2018 - 2020** Especialização em Implantodontia.
Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas- APCD/São Carlos
- 2018 - 2021** Doutorado em Odontologia, área de Implantodontia.
Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAr/UNESP

Dedico esta tese de doutorado a todos aqueles que participaram da minha formação como pessoa, dentista e pesquisadora.

AGRADECIMENTOS

A Deus por Seu amor infinito que cobre todas minhas fraquezas e por ser maior que todos os obstáculos na minha vida.

Aos meus pais Luís Antônio de Araújo e Rosair Maria dos Reis Araújo, que são minha inspiração diária e meus eternos educadores. Obrigada por construírem meu caráter, me ensinando princípios de honestidade, dignidade, responsabilidade, solidariedade, respeito ao próximo e esperança, que são cruciais em minha caminhada. E acima de tudo, obrigada pelos sacrifícios que vocês fazem diariamente para me darem o que nem vocês tiveram! Vocês ultrapassam sempre os deveres essenciais de pais! Amo vocês!

Aos meus irmãos Absaí Bernardes dos Reis Neto e Frederico Araújo dos Reis, por cuidarem sempre de mim, e por serem os melhores irmãos e amigos que alguém pode ter.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Geraldo Vaz, obrigada por cumprir com função de professor, mentor e principalmente amigo, por abrir portas no seletor mundo da pós-graduação brasileira, confiar em mim e agregar-me à sua equipe de trabalho.

Ao Professor Joni Augusto Cirelli e toda sua equipe, em especial a **Dra. Natália Da Ponte Leguizamón** e **Dra Mariana Cominotte**, por toda parceria, paciência e auxílio na execução deste trabalho.

Ao Professor Cássio do Nascimento da FORP-USP e sua orientada Ma. Yumi Chokyu Del Rey, por disponibilizarem seu laboratório e serem sempre tão solícitos às nossas necessidades.

A todos os funcionários da FOAr-Unesp, cujo trabalho e dedicação possibilitaram a minha formação e realização dessa tese.

Ao LMA-IQ e ao técnico Diego pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À

FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(Proc. 2017/081927) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.
Charles Chaplin*

* <https://www.crmpr.org.br>

Reis BA. Comportamento de células MC3T3 e adesão bacteriana em liga β Ti-35Nb-7Zr-5Ta caracterizada com íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e PO_3^{4-} [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

Reabilitações com implantes dentais são procedimentos rotineiros na prática odontológica atual. Altas taxas de sobrevivência do implante foram alcançadas nas últimas décadas devido a modificações contínuas no design do implante e na topografia da superfície, no entanto ainda há uma busca contínua para o controle da perda óssea peri-implantar. São escassos os trabalhos que apresentem dados da atividade osteoblástica nas superfícies tratadas concomitante a resultados da proliferação de bactérias nas mesmas, que podem desencadear perda óssea ou peri-implantite, processo patológico que deve ser considerado em longo prazo. O objetivo do trabalho foi desenvolver ligas de Ti-35Nb-7Zr-5Ta (TNZT), realizar tratamentos de superfície com íons cálcio e fosfato e íons magnésio por deposição de plasma eletrolítico (PEO) e avaliar os distintos tratamentos quanto a morfologia, composição química, rugosidade, molhabilidade e adesão do filme. Avaliou-se em seguida a adesão e proliferação de células MC3T3 com teste de alamar blue, FEG/SEM, MTT e fosfatase alcalina. As espécies microbianas foram identificadas e quantificadas pelo método de hibridização DNA-DNA Checkerboard. Foram avaliados 3 grupos diferentes: grupo polido (sem anodização), grupo CaP (β -glicerofosfato de sódio 0,04mol/L+ acetato de cálcio 0,35 mol/L, 300V, 2,5A, 60 seg) e grupo Mg (0,1 mol/L cloreto de Mg, 200V, 60seg. O grupo CaP e Mg alteraram a morfologia, rugosidade, molhabilidade e cristalinidade da liga TNZT. A adesão dos filmes do grupo CaP e Mg resistiram a uma maior força de tração. Menor quantidade total de bactérias foi identificada no grupo Mg e diferenças relevantes foram encontradas no perfil microbiano associado aos diferentes tratamentos de superfície. As células MC3T3 conseguiram aderir e proliferar mais rapidamente nos grupos tratados. No teste alamar blue o grupo CaP apresentou maior atividade metabólica no dia 21. No teste de fosfatase alcalina, o grupo CaP induziu maior expressão de ALP no dia 10. As análises preliminares in vitro sugeriram possíveis vantagens dos tratamento de superfície, sendo que o grupo CaP foi mais benéfico para adesão e proliferação celular, enquanto o grupo Mg reduziu a adesão de bactérias.

Palavras chave: Biofilmes. Titânio. Ligas. Biologia celular. Osseointegração.

Reis BA. Behavior of MC3T3 cells and bacterial adhesion in β Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy characterized with Mg^{2+} , Ca^{2+} and PO_3^{4-} ions. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

Dental implant rehabilitations are routine procedures in current dental practice. High implant survival rates have been achieved in recent decades due to continual modifications in implant design and surface topography, however there is still an ongoing quest to control peri-implant bone loss. There are few studies that present data on osteoblastic activity on treated surfaces, concomitant with the results of bacterial proliferation on them, which can trigger bone loss or peri-implantitis, a pathological process that should be considered in the long term. The objective of this work was to develop Ti-35Nb-7Zr-5Ta (TNZT) alloys, perform surface treatments with calcium and phosphate ions and magnesium ions by electrolytic oxidized plasma (PEO) and evaluate the different treatments in terms of morphology, chemical composition, roughness, wettability and adhesion of the film. The adhesion and proliferation of MC3T3 cells were then evaluated with the alamar blue, FEG/SEM, MTT and alkaline phosphatase tests. The microbial species were identified and quantified by the DNA-DNA Checkerboard hybridization method. Three different groups were evaluated: polished group (without anodizing), CaP group (sodium β -glycerophosphate 0.04mol/L+ calcium acetate 0.35mol/L, 300V, 2.5A, 60 sec) and Mg group (0,1 mol/L Mg chloride, 200V, 60sec. The CaP and Mg group changed the morphology, roughness, wettability and crystallinity of the TNZT alloy. The adhesion of the films of the CaP and Mg group resisted a higher tensile strength. Less amount total bacteria was identified in the Mg group and relevant differences were found in the microbial profile associated with the different surface treatments. MC3T3 cells were able to adhere and proliferate more quickly in the treated groups. In the alamar blue test, the CaP group showed greater metabolic activity on day 21 In the alkaline phosphatase test, the CaP group induced greater expression of ALP on day 10. Preliminary in vitro analyzes suggested possible advantages of surface treatments, with the CaP group being more beneficial for cell adhesion and proliferation, while the Mg group reduce the adhesion of bacteria on its surface

Keywords: Biofilms. Alloys. Titanium. Cell biology. Osseointegration.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Tratamento de superfície e comportamento celular.....	12
1.2 Comportamento bacteriano.....	15
2 PROPOSIÇÃO	17
3 PUBLICAÇÕES	18
3.1 Publicação 1	19
3.2 Publicação 2	34
4 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE A	57

1 INTRODUÇÃO

Desde o início da implantodontia moderna proposta por Branemark na década de 1960¹ até dias atuais, materiais a base de titânio são utilizados na manufatura de implantes dentários. O titânio comercialmente puro (TiCp) contém características interessantes, como biocompatibilidade, baixa densidade e boa resistência à corrosão,^{2,3} e além de ser biocompatível, propriedades mecânicas, físicas e químicas devem ser consideradas na manufatura dos implantes dentários para um melhor desempenho clínico a longo prazo.

De acordo com Letic-Gavrilovic et al.⁴, a combinação de propriedades ligadas à biocompatibilidade, à corrosão e ao comportamento mecânico faz do TiCp um material único em aplicações ligadas à ortopedia e à odontologia. Já para Mohamed et al.⁵, 2006 com a adição de outros elementos ao TiCp, obtendo as ligas de titânio, é possível agregar ao material propriedades ainda mais favoráveis, como menor módulo de elasticidade, otimização da osseointegração e ação antibacteriana.

Com a utilização das ligas de titânio, é possível aprimorar as propriedades biológicas, mecânicas, físicas e químicas que podem favorecer o desempenho a longo prazo dos implantes,⁶⁻⁸ e considerando que implantes dentais são submetidos constantemente a grandes esforços, é essencial a escolha minuciosa do material utilizado para confecção dos mesmos. A fabricação de dispositivos para implantes empregados na restauração de tecidos duros exige materiais com um conjunto específico de características que inclui elevada resistência à corrosão, ótima biocompatibilidade, alta resistência mecânica e baixo módulo de elasticidade

As ligas Ti6Al4V são utilizadas em aplicações odontológicas por suas excelentes propriedades mecânicas e resistência à corrosão. No entanto, seu módulo de elasticidade (~110 GPa) é bem mais elevado que o do osso humano (~10-30 GPa), o que gera a “proteção contra estresse”⁹. Esse efeito de proteção contra estresse, que origina da disparidade do módulo de elasticidade entre os materiais de implante e os ossos humanos, pode causar uma redução na densidade óssea e resultar no afrouxamento dos implantes em longo prazo. Além disso, a presença do elemento tóxico vanádio (V) na liga Ti6Al4V também gera preocupações pela liberação de íons tóxicos no corpo humano¹⁰.

Long et al.¹¹, 1998 avaliaram implantes de materiais metálicos de alta rigidez como o aço inoxidável ou ligas metálicas do sistema Cromo-Cobalto, e observaram que os materiais podem promover a reabsorção óssea, que eventualmente pode causar a soltura do implante ou mesmo a fratura do leito ósseo onde o implante foi inserido. Atualmente, esforços ligados ao desenvolvimento de materiais metálicos a serem aplicados na restauração de tecidos duros estão focados nas ligas de titânio do tipo β metaestável.^{7,12}

O titânio possui duas estruturas cristalinas, conhecidas como fases α e β . A fase α está relacionada à estrutura estável em temperatura ambiente, a qual é denominada estrutura hexagonal compacta. Ao elevar a temperatura a aproximadamente 883°C, a fase α transforma-se em β , representada por uma estrutura cúbica de corpo centrado¹³⁻¹⁵. Com a adição de elementos de liga ao Ti, são obtidas ligas com estruturas cristalinas estáveis em temperatura ambiente. As fases α e β são base para três tipos de ligas de Ti: α , $\alpha+\beta$ e β , que têm suas estruturas relacionadas com o tipo de elemento de liga utilizado¹⁴. Os elementos de liga podem ser classificados como α -estabilizador, β -estabilizador e neutro.

Para manufatura de implantes dentários é interessante utilizar ligas do tipo β por estas possuírem reduzido módulo de elasticidade e elevada resistência mecânica. Como estabilizador β típico de ligas de Ti, o elemento Nb tem muitas vantagens em relação às ligas de Ti, como a mesma estrutura cristalina do Ti, raio atômico semelhante, solução sólida infinita e nenhuma toxicidade biológica. No trabalho Bidaux J et al.¹⁶, 2014 mostraram que a adição de elemento Nb e Ta às ligas de Ti podem diminuir consideravelmente o módulo de elasticidade. A adição do elemento Zr às ligas de Ti pode aumentar a resistência à tração e suprimir a formação de martensita^{15,17}.

Sendo assim, é desejável que o material utilizado para manufatura de implantes tenha módulo de elasticidade próximo ao do osso humano¹⁸, resistência e plasticidade favoráveis na substituição de tecidos duros, sejam livres de elementos de toxicidade biológica e não sofram corrosão no meio biológico. Com a confecção de um material com características físico-mecânicas favoráveis, há possibilidade de elevar ainda mais a efetividade do material com tratamentos de superfícies.

A necessidade de encontrar um material biocompatível sempre motivou inúmeros estudos na área de biomateriais e pesquisas com implantes dentários fazem parte destas buscas por serem utilizados para recuperação ou reposição de parte funcional do corpo humano¹. Para cumprirem sua finalidade, implantes dentais devem ter ausência de toxicidade, ou seja, ser bioinerte. No entanto, após as diversas pesquisas na área, atualmente é possível obter implantes com superfícies bioativas que otimizam ainda mais o tratamento reabilitador^{19,20}. A forma de confecção e preparo dessas superfícies de titânio para utilização como implantes dentários passou do uso de superfícies simplesmente usinadas^{21,22} (ainda em uso), para superfícies altamente modificadas e funcionalizadas^{20,23}, que permitem alterações de uma ampla gama de propriedades da superfície da camada de óxidos de titânio.

Características macroscópicas e microscópicas dos implantes são constantemente aperfeiçoadas a fim de obter um material com propriedades que favoreçam a utilização destes

dispositivos inovadores em situações clínicas desafiadoras, nas quais podem haver um comprometimento da quantidade e qualidade do contato osso implante. Reabilitações com implantes curtos ainda não são muito utilizados por receio da perda de suporte ósseo no processo da reabilitação, no entanto, o aprofundamento de pesquisas para seleção de materiais corretos na fabricação dos dispositivos e tratamentos de superfícies efetivos, podem proporcionar uma melhor previsibilidade no tratamento a curto e longo prazo, evitando a morbidade das cirurgias de enxertos ósseos.

1.1 Tratamentos de superfície e comportamento celular

Em um implante, a osseointegração está relacionada com a competição entre fibroblastos e osteoblastos²⁴. Enquanto superfícies lisas favorecem o crescimento de fibroblastos, uma superfície mais irregular favorece o crescimento e fixação de células de osteoblastos. O crescimento de tecidos fibrosos na superfície do implante reduz a possibilidade de formação de uma ligação forte e bem estabelecida na interface osso-implante, que por sua vez depende das células osteoblásticas. Uma interação mecânica ineficiente entre o implante e o osso pode causar a perda do implante²⁵. O titânio e suas ligas possuem a característica de formação de uma camada de passivação de TiO₂ quando expostos ao oxigênio, e essa camada potencializa a bioatividade do material, favorecendo a osseointegração^{7,26}.

Estudos da literatura sugerem que o sucesso da osseointegração de implantes aumenta com a modificação da superfície dos mesmos, produzindo uma camada superficial de TiO₂ nano-estruturada^{27,28}. A composição química da camada de TiO₂ está diretamente relacionada a biocompatibilidade do material⁷.

Diversas técnicas são utilizadas para essas modificações superficiais, como revestimento de vidro bioativo, jateamento com spray, técnicas de sol-gel, anodização eletroquímica, entre outros, transformando as superfícies em potencialmente bioativas²⁹⁻³¹. A deposição por Plasma Eletrolítico (PEO) modifica a camada do filme de óxido de titânio, tornando-a mais aderente e porosa, com melhores propriedades biológicas²⁹. O mecanismo da modificação da camada de óxido sob condições de anodização é bem conhecido^{2,29,32}.

Superfícies de implantes submetidos à PEO, apresentam características morfológicas que facilitam a adesão, orientação e formação óssea com maior rapidez, permitindo a inserção dos implantes em regiões com baixas densidades e acelera o carregamento dos implantes³³.

Esta técnica de oxidação consiste em um sistema de formação ânions e cátions que permite a incorporação de substâncias do eletrólito à interface do material, permitindo a

formação de revestimentos com morfologia e química semelhante à composição mineral do tecido ósseo, como quando utilizado íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato(PO_3^{4-}) na solução eletrolítica. A incorporação destes íons é uma modificação de superfície comumente utilizada para alterar a camada de óxido do titânio, e sabe-se que incorporação de íons Ca^{2+} e PO_3^{4-} auxiliam a formação de apatita óssea e maior adesão e proliferação de osteoblastos³⁴, sendo relevantes no metabolismo e mineralização óssea, angiogênese e homeostase dos tecidos ósseos³⁵.

Conforme mostrado por Ellingsen et al.³⁶, 1991 a presença de cálcio na superfície do implante aumenta a taxa de precipitação da hidroxiapatita, devido ao aumento da capacidade de absorção de proteínas. Resultados semelhantes foram observados por Jones et al.³⁷, 2001. Conforme explicado por Guo et al.³⁸, 2012 os íons Ca^{2+} têm a capacidade de atrair proteínas, resultando em uma osseointegração mais rápida³⁸.

Segundo Gnedenkova et al.³⁹, 2017 o mecanismo da influência dos revestimento de fosfato de cálcio na regeneração do tecido ósseo é mediado por diversos fatores, um dos quais é o envolvimento do revestimento bioativo no processo de formação do novo tecido ósseo como provedor dos elementos necessários, particularmente cálcio e fósforo. As propriedades físicas e químicas da hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, conferem-lhe biocompatibilidade, estimulando reestruturação do tecido ósseo. Outra influência é o aumento da resistência de união entre o tecido ósseo e o implante devido a composição química do revestimento, que consiste em materiais nativos do corpo.

Outro tratamento de superfície viável por PEO é incorporação de magnésio à camada de óxido do titânio, que é capaz de regular a expressão das integrinas nas células ósseas no estágio inicial da osteogênese, sendo crucial para formação e metabolismo ósseo⁴⁰. A dopagem com íons Mg^{2+} promove a diferenciação osteoblástica de células humanas indiferenciadas^{41,42}, aumenta a calcificação e a densidade mineral de osso⁴³, além de acelerar a osseointegração ao redor de implantes⁴⁴⁻⁴⁷.

Sul et al.⁴⁸, 2005 adicionaram íons de Mg^{2+} em implantes de TiCp pela técnica da PEO. Utilizaram duas placas de platina como cátodos e os implantes como ânodos. O grupo controle foi oxidado em ácido acético e o grupo teste foi oxidado em um eletrólito contendo íons Mg^{2+} . Em seguida, implantes de ambos grupos foram inseridos nos fêmures de coelhos por 6 semanas, e analisaram a resistência ao torque destes implantes. No grupo teste (Mg), o valor do torque de remoção foi consideravelmente maior que no grupo controle, concordando então com as evidências positivas para a teoria de ligação bioquímica mediada por química de superfície de implantes bioativos oxidados.

Sul et al.⁴⁹, 2006 compararam a velocidade, a força da osseointegração e a osteocondutividade entre um implante experimental oxidado com íons Mg^{2+} , um implante TiUnite oxidado disponível comercialmente e um implante Osseotite de superfície com duplo ataque ácido. O objetivo foi avaliar quais propriedades de superfície aumentariam a resposta óssea aos implantes e, assim, testar uma teoria de ligação bioquímica. Os resultados indicaram que a superfície que facilitou a osseointegração mais rápida e mais forte dos implantes foi o grupo incorporado com Mg^{2+} , apesar de sua aspereza mínima em comparação com TiUnite moderadamente rugoso. Isso sugere vantagens potenciais dos implantes de Mg para reduzir taxas de falha do implante no estágio pós-implantação inicial e em áreas ósseas comprometidas, tornando possível encurtar o tempo de cicatrização óssea desde a cirurgia até a carga funcional, aumentando a possibilidade de carga imediata.

Kim et al.⁴¹, 2012 incorporaram íons Mg^{2+} em discos de Ti após jateamento de areia mais ataque ácido, usando uma técnica de implantação de íons por plasma. Os íons foram implantados em toda superfície desejada, utilizando uma fonte de plasma metálico. Este plasma de íons metálicos foi gerado por uma fonte em arco a vácuo e incorporando na superfície dos discos. Discos apenas com jateamento mais ataque ácido foram utilizados como controle. Células mesenquimais humanas foram cultivadas para avaliar proliferação e adesão celular por meio de ensaio MTT. No dia 1, a proliferação de células cultivadas em SLA Ti ($0,37 \pm 0,03$) foi menor que a das células cultivadas em Ti Mg-SLA ($0,62 \pm 0,06$) e esta diferença foi observada continuamente até 15 dias.

Na-Ren et al.⁵⁰, 2014 compararam superfícies modificadas com íons Mg, íons Ca e grupo controle sem tratamento. Em seguida cultivaram células de medula óssea de ratos sobre as superfícies, para ver a efetividade da adsorção de proteína e também a capacidade de aumentar a adesão e diferenciação destas células. Notaram que nas amostras contendo Mg^{2+} e Ca^{2+} , o número de células aumentaram até quatro vezes em relação ao controle, e o grupo com Ca^{2+} teve uma pequena vantagem em relação ao grupo com Mg^{2+} na diferenciação celular.

Galli et al.⁴⁰, 2016 incorporaram íons Mg^{2+} em implantes de titânio, e avaliaram a liberação destes íons em modelos animais osteoporóticos. Implantes sem nenhum revestimento foram utilizados como controle. Os resultados mostraram que após a colocação dos dispositivos, houve formação do coágulo em torno dos implantes e novo tecido osseo foi visível após 7 dias de instalação dos mesmos, sendo que o volume de tecido ósseo neoformado foi consideravelmente maior nos espécimes revestidos com íons Mg^{2+} .

Wang et al.⁵¹, 2016 avaliaram a proliferação e diferenciação de células pré osteoblásticas MC3T3 em implantes de Ti6Al4V contendo íons bioativos (Ca^{2+} e Mg^{2+})

adicionados por processo hidrotermal. Os resultados dos testes in vitro indicaram que Ca^{2+} e Mg^{2+} na superfície da liga de titânio favoreceu a fixação, proliferação e diferenciação das células. As células cultivadas em superfície com íons Ca^{2+} exibiram níveis de diferenciação significativamente maiores nos testes de ALP e atividade mineralização em comparação com a superfície modificadas com íons Mg^{2+}

1.2 Comportamento bacteriano

A rugosidade da superfície de implantes dentais parece ser um fator importante na capacidade de colonização de certas espécies bacterianas⁵². Bactérias preferencialmente aderem em superfície que se conformam ao seu tamanho, uma vez que isso maximiza a área de superfície da bactéria. Irregularidades das superfícies proporcionais ao tamanho da bactéria aumentam sua área de contato e, portanto, o potencial de ligação, enquanto as irregularidades muito maiores que o tamanho da bactéria se aproximam do potencial de ligação de uma superfície plana⁵³. Para uma determinada superfície, diferentes espécies de bactérias se aderem de maneira diferente, uma vez que apresentam diferentes características físico-químicas. Geralmente, as bactérias com propriedades hidrofóbicas preferem superfícies de material hidrofóbico; aqueles com características hidrofílicas preferem superfícies hidrofílicas

54

A incorporação de íons $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{PO}_4^{3-}$ e Mg^{2+} são capazes de alterar diversos fatores no titânio e suas ligas que interferem na atividade osteoblástica e antibacteriana, como rugosidade, hidrofiliabilidade, fase cristalina da superfície, composição química e cargas de superfície. De acordo com Wang et al.⁵⁵, 2019 cations divalentes são relacionados ao aumento da formação de biofilme especialmente por sua capacidade de ligação a superfície das bactérias carregadas negativamente. Íons Ca^{2+} participam da fixação de bactérias mediada por adesina sendo capaz de modificar sua estrutura, e esta, ao se ligar à estrutura dos íons, fortalece e facilita a extensão da proteína da superfície da célula ao substrato⁵⁶. No entanto pesquisadores observaram um efeito inibitório mediado por proteínas causado pela adição de Ca^{2+} em biofilmes de *Staphylococcus aureus*.⁵⁷

No estudo de Robinson et al.⁵⁸, 2010 observaram que a degradação do Mg^{2+} em uma solução fisiológica poderia resultar em aumentos rápidos tanto da concentração de Mg^{2+} quanto do valor do pH na solução, e este último é capaz de inibir a sobrevivência bacteriana, conferindo uma função antibacteriana do magnésio. Isso ocorre porque as bactérias conseguem se manterem vivas geralmente em um ambiente com pH de 6,0-8,0, sendo

geralmente este o limite em que as bactérias conseguem manter um pH citoplasmático compatível com as integridades funcionais e estruturais das proteínas citoplasmáticas.

Mihailescu et al.⁵⁹, 2016 recobriram superfícies de titânio com hidroxiapatita, MgF_2 ou MgO , e em seguida testaram o potencial microbiológico destes tratamentos em três cepas isoladas de pacientes: *Micrococcus* sp., *Enterobacter* sp. E *Candida albicans* sp. Os filmes contendo MgO induziram uma diminuição da adesão de *Micrococcus* sp e *Enterobacter* sp, quantificadas após 24 h de incubação, em relação ao controle de Ti. Além disso, após 48 h, o mesmo grupo diminuiu pelo menos 1 log a capacidade das cepas *Enterobacter* sp e *Candida* sp de se aderirem e multiplicarem na superfície testada.

No entanto, alguns autores mostram que a perda óssea marginal em torno de implantes moderadamente ásperos são maiores em comparação com o implante de superfície lisas, apesar de não ser significativo estatisticamente^{60,61}. Considerando que atualmente a periimplantite é uma condição clínica recorrente e essas superfícies que visam otimizar a osseointegração são possíveis materiais para fabricação de implantes curtos, é interessante entender a influência de tais tratamentos no comportamento bacteriano.

Grande parte dos trabalhos foram realizados em TiCp ou ligas de Ti-6Al-4V. Não há trabalhos que relatem o comportamento de células osteoblásticas e de bactérias em ligas de Ti-35Nb-7Zr-Ta após tratamento por PEO com íons promissores osteogênicos, como Ca^{2+} , PO_4^{3-} e Mg^{2+} , bem como não há um consenso sobre qual tratamento é mais efetivo ao avaliar o potencial osteoindutor e antibacteriano dos biomateriais.

Assim, elementos de liga de Nb, Zr e Ta foram selecionados neste trabalho para formar uma liga β de titânio, originando a liga Ti-35Nb-7Zr-Ta que foi fundida e depois submetida distintos tratamentos de superfície, para avaliarmos detalhadamente os efeitos da modificação da superfície via PEO, originando 3 grupos, sendo um sem anodização (polido), o segundo grupo com adição de Ca^{2+} e PO_4^{3-} (CaP) e o terceiro com adição de Mg^{2+} (Mg).

Testes de morfologia, composição química, difração de raio x, modulo de elasticidade, tensão e deformação foram realizados em 9 amostras de cada grupo. Em seguida, células MC3T3 foram cultivadas nos discos e todos os grupos com os respectivos tratamentos foram avaliados a viabilidade celular após cultura células mesenquimais da medula óssea de ratos avaliados pelo MEV, Alamar Blue, MTT e fosfatase alcalina. Por fim, espécies microbianas foram identificadas e quantificadas pelo método de hibridização DNA-DNA Checkerboard. A metodologia detalhada está no Apêndice A.

4 CONCLUSÃO

Os tratamentos eletroquímicos propostos promoveram modificações químicas, físicas e topográficas das propriedades da liga de titânio interessantes para uso como implante dental. Ambos tratamentos aumentaram a rugosidade do material e tiveram comportamento hidrofílico.

O grupo CaP modificou a morfologia da superfície em forma de poros, enquanto o Mg modificou em forma de folhas. O ângulo de contato foi estatisticamente menor no grupo Mg e a rugosidade média foi maior nos grupos CaP e Mg.

A contagem microbiana total foi significativamente menor no grupo Mg

O perfil microbiano foi diferente para os grupos investigados com menor expressão das bactérias *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas endodontalis* e *Peptostreptococcus anaerobius* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no grupo Mg

Para avaliação microbiológica, o grupo Mg apresentou resultados mais satisfatórios e animadores para confecção de implantes dentários.

As células conseguiram aderir e proliferar mais rapidamente nos grupos tratados. No teste alamar blue o grupo CaP apresentou maior atividade metabólica no dia 21. No teste de fosfatase alcalina, o grupo CaP induziu maior expressão de ALP no dia 10. As análises preliminares *in vitro* sugeriram possíveis vantagens dos tratamentos de superfície, especialmente do grupo CaP,

O grupo CaP parece favorecer mais processos de osseointegração quando comparado ao grupo Mg, no entanto no grupo Mg menos bactérias foram identificadas. Mais estudos precisam ser realizados para entender a relevância de cada um destes tratamentos em modelos animais e também testar ambos tratamentos juntos em um mesmo material.

REFERÊNCIAS*

1. Brånemark P-I, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson Å. Intraosseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental Studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81–100.
2. Kuromoto NK, Simão RA, Soares GA. Titanium oxide films produced on commercially pure titanium by anodic oxidation with different voltages. *Mater Charact*. 2007;58(2):114–21.
3. Rosales-Leal JI, Rodríguez-Valverde MA, Mazzaglia G, Ramón-Torregrosa PJ, Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, et al. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2010;365(1–3):222–9.
4. Letic-Gavrilovic A, Scandurra R, Abe K. Genetic potential of interfacial guided osteogenesis in implant devices. *Dent Mater J*. 2000;19(2):99–132.
5. Mohamed Abdel Hady, Keita Hinoshita MM. General approach to phase stability and elastic properties of β -type Ti-alloys using electronic parameters. *Scr Mater*. 2006;55(5):477–80.
6. Sharma A, McQuillan AJ, A Sharma L, Waddell JN, Shibata Y, Duncan WJ. Spark anodization of titanium–zirconium alloy: surface characterization and bioactivity assessment. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(8):1–11.
7. Ribeiro ALR, Hammer P, Vaz LG, Rocha LA. Are new TiNbZr alloys potential substitutes of the Ti6Al4V alloy for dental applications? An electrochemical corrosion study. *Biomed Mater*. 2013;8(6):065005.
8. Bai Y, Deng Y, Zheng Y, Li Y, Zhang R, Lv Y, et al. Characterization, corrosion behavior, cellular response and in vivo bone tissue compatibility of titanium-niobium alloy with low Young's modulus. *Mater Sci Eng C*. 2016;59:565–76.
9. Geetha M, Kamachi Mudali U, Gogia AK, Asokamani R, Raj B. Influence of microstructure and alloying elements on corrosion behavior of Ti-13Nb-13Zr alloy. *Corros Sci*. 2004;46(4):877–92.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

10. Rao S, Ushida T, Tateishi T, Okazaki Y AS. Effect of Ti, Al, and V ions on the relative growth rate of fibroblasts (L929) and osteoblasts (MC3T3-E1) cells. *Biomed Mater.* 1996;6(2):79–86.
11. Long M, Rack H. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials.* 1998;19(18):1621–39.
12. Reis BA, Fais LM, Ribeiro ALR, Vaz LG. Comparison of Ti–35Nb–7Zr–5Ta and Ti–6Al–4V hydrofluoric acid/magnesium-doped surfaces obtained by anodizing. *Heliyon.* 2020;6(8):e04762.
13. Gilbert JL. Step-polarization impedance spectroscopy of implant alloys in physiologic solutions. *J Biomed Mater Res.* 1998;40(2):233–43.
14. Choi MG, Koh HS, Kluess D, O'Connor D, Mathur A, Truskey GA, et al. Effects of titanium particle size on osteoblast functions in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(12):4578–83.
15. Ribeiro ALR, Junior RC, Cardoso FF, Filho RBF, Vaz LG. Mechanical, physical, and chemical characterization of Ti-35Nb-5Zr and Ti-35Nb-10Zr casting alloys. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(8):1629–36.
16. Bidaux J-E, Pasquier R, Rodriguez-Arbaizar M, Girard H, Carreño-Morelli E. Low elastic modulus Ti–17Nb processed by powder injection moulding and post-sintering heat treatments. *Powder Metall.* 2014;15;57(5):320–3.
17. Hao YL, Li SJ, Sun SY, Yang R. Effect of Zr and Sn on Young's modulus and superelasticity of Ti–Nb-based alloys. *Mater Sci Eng A.* 2006;441(1–2):112–8.
18. FG Evans. The mechanical properties of bone. *Artif Limbs.* 1969;13(1):37–48.
19. Sul Y-T, Jeong Y, Johansson C, Albrektsson T. Oxidized, bioactive implants are rapidly and strongly integrated in bone. Part 1--experimental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(5):521–6.
20. Laurindo CAH, Torres RD, Mali SA, Gilbert JL, Soares P. Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: effect of high current density. *Mater Sci Eng C.* 2014;37(1):223–31.
21. Wennerberg A et al. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials.* 1996;17(1):15–22.
22. Lazzara RJ, Porter SS, Testori T, Galante J, Zetterqvist L. A prospective multicenter study evaluating loading of osseotite implants two months after placement: one-year results. *J Esthet Dent.* 1998;10(6):280–9.

23. Oliveira WF, Arruda IRS, Silva GMM, Machado G, Coelho LCBB, Correia MTS. Functionalization of titanium dioxide nanotubes with biomolecules for biomedical applications. *Mater Sci Eng C*. 2017;81(May):597–606.
24. Cremasco A, Messias AD, Esposito AR, Duek EADR, Caram R. Effects of alloying elements on the cytotoxic response of titanium alloys. *Mater Sci Eng C*. 2011;31(5):833–9.
25. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. 11(5):391–401.
26. Oh S, Daraio C, Chen L-H, Pisanic TR, Fiñones RR, Jin S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. *J Biomed Mater Res Part A*. 2006;78A(1):97–103.
27. Huo K, Gao B, Fu J, Zhao L, Chu PK. Fabrication, modification, and biomedical applications of anodized TiO₂ nanotube arrays. *RSC Adv*. 2014;4(33):17300–24.
28. Kasperczyk J, Jelonek K, Ryba M, Walski M, Bero M. Application of the lithium and magnesium initiators for the synthesis of glycolide. *J Biomed Res A*. 2006;79(4):865–73.
29. Ishizawa Hitoshi, Ogino Makoto. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. *J Biomed Mater Res*. 1995;29(1):65–72.
30. Hench LL. Bioceramics: from Concept to Clinic. *J Am Ceram Soc*. 1991;74(7):1487–510.
31. Kim JM, Kim HS. Processing and properties of a glass-ceramic from coal fly ash from a thermal power plant through an economic process. *J Eur Ceram Soc*. 2004;24(9):2825–33.
32. Wang Y, Lei T, Jiang B, Guo L. Growth, microstructure and mechanical properties of microarc oxidation coatings on titanium alloy in phosphate-containing solution. *Appl Surf Sci*. 2004;233(1–4):258–67.
33. Carlos Nelson Elias LES. Biocompatibilidade do titânio e a superfície vulcano. *Rev Bras Implantodont*. 2006;12(3):6–11.
34. Li B, Hao J, Min Y, Xin S, Guo L, He F, et al. Biological properties of nanostructured Ti incorporated with Ca, P and Ag by electrochemical method. *Mater Sci Eng C*. 2015;51:80–6.
35. Sul YT. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: Special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. *Biomaterials*. 2003;24(22):3893–907.
36. Ellingsen J. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials*. 1991;12(6):593–6.
37. Jones F. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surf Sci Rep*. 2001;42(3–5):75–205.

38. Yan Guo C, Tin Hong Tang A, Pekka Matinlinna J. Insights into surface treatment methods of titanium dental implants. *J Adhes Sci Technol*. 2012;26(1–3):189–205.
39. Gnedenkov S V., Sinebryukhov SL, Puz' A V., Kostiv RE. In vivo osteogenerating properties of calcium phosphate coatings on Ti-6Al-4V titanium alloy. *Biomed Eng*. 2017;51(2):116–9.
40. Galli S, Andersson M, Jinno Y, Karlsson J, He W, Xue Y, et al. Magnesium release from mesoporous carriers on endosseous implants does not influence bone maturation at 6 weeks in rabbit bone. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2016;105(7):1–8.
41. Kim B-S, Kim JS, Park YM, Choi B-Y, Lee J. Mg ion implantation on SLA-treated titanium surface and its effects on the behavior of mesenchymal stem cell. *Mater Sci Eng C*. 2013;33(3):1554–60.
42. Jiang X, Wang G, Li J, Zhang W, Xu L, Pan H, et al. Magnesium ion implantation on a micro/nanostructured titanium surface promotes its bioactivity and osteogenic differentiation function. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:23-87.
43. Kim SR, Lee JH, Kim YT, Riu DH, Jung SJ, Lee YJ, et al. Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors. *Biomaterials*. 2003;24(8):1389–98.
44. Galli S, Naito Y, Karlsson J, He W, Andersson M, Wennerberg A, et al. Osteoconductive potential of mesoporous titania implant surfaces loaded with magnesium: An experimental study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17(6):1048–59.
45. Cecchinato F, Karlsson J, Ferroni L, Gardin C, Galli S, Wennerberg A, et al. Osteogenic potential of human adipose-derived stromal cells on 3-dimensional mesoporous TiO₂ coating with magnesium impregnation. *Mater Sci Eng C*. 2015;52:225–34.
46. Park JW, An CH, Jeong SH, Suh JY. Osseointegration of commercial microstructured titanium implants incorporating magnesium: a histomorphometric study in rabbit cancellous bone. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(3):294–300.
47. Oliveira FG, Ribeiro AR, Perez G, Archanjo BS, Gouvea CP, Araújo JR, et al. Understanding growth mechanisms and tribocorrosion behaviour of porous TiO₂ anodic films containing calcium, phosphorous and magnesium. *Appl Surf Sci*. 2015;341:1–12.
48. Sul Y-T, Johansson C, Byon E, Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomaterials*. 2005;26(33):6720–30.
49. Sul Y-T, Johansson C, Albrektsson T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. *Int J Prosthodont*. 19(4):319–28.

50. Ren N, Li J, Qiu J, Sang Y, Jiang H, Boughton RI, et al. Nanostructured titanate with different metal ions on the surface of metallic titanium: a facile approach for regulation of rBMSCs fate on titanium implants. *Small*. 2014;10(15):3169–80.
51. Wang T, Wan Y, Liu Z. Synergistic effects of bioactive ions and micro/nano-topography on the attachment, proliferation and differentiation of murine osteoblasts (MC3T3). *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(8):133.
52. Almaguer-Flores A, Ximénez-Fyvie LA, Rodil SE. Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: effect of surface roughness and culture media. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2010;92(1):196–204.
53. Katsikogianni M, Missirlis YF, Harris L, Douglas J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cells Mater*. 2004;8:37–57.
54. Kreve S, Cândido dos Reis A. Influence of the electrostatic condition of the titanium surface on bacterial adhesion: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2021;125(3):416–20.
55. Wang T, Flint S, Palmer J. Magnesium and calcium ions: roles in bacterial cell attachment and biofilm structure maturation. *Biofouling*. 2019;35(9):959–74.
56. Chen G, Walker SL. Role of solution chemistry and ion valence on the adhesion kinetics of groundwater and marine bacteria. *langmuir*. 2007;1(13):7162–9.
57. Lee J-H, Kim Y-G, Yong Ryu S, Lee J. Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*. 2016;6(1):19267.
58. Robinson DA, Griffith RW, Shechtman D, Evans RB, Conzemius MG. In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomater*. 2010;6(5):1869–77.
59. Mihailescu N, Stan GE, Duta L, Chifiriuc MC, Bleotu C, Sopronyi M, et al. Structural, compositional, mechanical characterization and biological assessment of bovine-derived hydroxyapatite coatings reinforced with MgF₂ or MgO for implants functionalization. *Mater Sci Eng C*. 2016;59:863–74.
60. Jemt T, Stenport V, Friberg B. Implant treatment with fixed prostheses in the edentulous maxilla. Part 1: implants and biologic response in two patient cohorts restored between 1986 and 1987 and 15 years later. *Int J Prosthodont*. 2011;24(4):345–55.
61. do Nascimento C, de Albuquerque RF, Monesi N, Candido-Silva JA. Alternative method for direct DNA probe labeling and detection using the checkerboard hybridization format. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):3039–40.