

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 18/07/2020.



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



Maria Sílvia Maurício Rigolin

**Influência do envelhecimento de *abutments* de titânio e zircônia na adesão,
viabilidade e proliferação celular, e adesão de biofilme multiespécie**

Araraquara

2018



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



Maria Sílvia Maurício Rigolin

Influência do envelhecimento de *abutments* de titânio e zircônia na adesão, viabilidade e proliferação celular, e adesão de biofilme multiespécie

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), da Faculdade de Odontologia de Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, na Área de Prótese

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior

Araraquara

2018

Rigolin, Maria Silvia Maurício

Influência do envelhecimento de *abutments* de titânio e zircônia na adesão, viabilidade e proliferação celular, e adesão de biofilme multiespécie / Maria Silvia Maurício Rigolin. -- Araraquara: [s.n.], 2018
77 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Molloy Junior

1. Titânio 2. Cerâmica 3. Envelhecimento 4. Adesão celular 5. Bactérias I. Título

Maria Sílvia Maurício Rigolin

Influência do envelhecimento de *abutments* de titânio e zircônia na adesão, viabilidade e proliferação celular, e adesão de biofilme multiespécie

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de doutor em Reabilitação Oral

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior

2º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo (FOAr-UNESP)

3º Examinador: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

4º Examinador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek (FOB-USP)

5º Examinador: Profa. Dra. Ana Lucia Roselino Ribeiro (FACIT)

Araraquara, 10 de julho de 2018.

DADOS CURRICULARES

Maria Sílvia Maurício Rigolin

NASCIMENTO: 18/01/1988- Araraquara-São Paulo

FILIAÇÃO: Celso José Rigolin

Sônia Regina Maurício Rigolin

2007/2011 – Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP

2012/2014 – Mestrado em Reabilitação Oral, Área de Concentração Prótese – Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP

2015-2016- Especialização em Prótese Dentária - Faculdade Herrero/FAEPO

À Deus, por tornar possível tudo o que tenho e conquistei na minha vida. Senhor, obrigada por todas as vitórias conquistadas, por todos os sonhos realizados, por todas as provas vencidas.

Ao meu pai Celso José Rigolin e irmã Nathalia Maurício Rigolin, difícil escrever para vocês! Mas vamos lá! Muito obrigada pelo apoio, e simplesmente por tudo. Vocês com certeza me ensinaram e viveram momentos comigo que sempre estarão em minha memória e coração, amo e admiro vocês demais. Foram sempre a base para que eu pudesse chegar aonde cheguei. Pai, te admiro demais, com sua calma e exemplo, você cuidou de mim e da minha irmã, e sempre estave ao meu lado mesmo sem que eu pudesse perceber. Fofa ou carinhosamente Brucutu (pelo tamanho), você se tornou uma pessoa e mulher a qual me orgulho e admiro demais. Amo vocês e sou eternamente grata por tudo!

À minha avó Leonor Franscicatti Maurício (*in memoriam*), exemplo de mãe (aquela que foi a minha mãe), de avó, de pessoa, bondade e fé, que me ensinou tudo e que fez com que eu pudesse crescer e chegar até aqui, sinto muito sua falta. Fiz e faço tudo pensando o que a senhora acharia, e se teria orgulho de mim! Uma das melhores pessoas que já conheci. Pensa numa saudade infinita, espero que onde estiver sinta orgulho de mim!

À minha avó Laura Buozi Rigolin (*in memoriam*), um grande exemplo de mulher de fé e bondade, simplicidade e amor para com todos! Saudades vó.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao estimado Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Júnior (“Chefe”), meu orientador. Obrigada pelo seu exemplo, por tudo que me ensinou, e por ser uma pessoa fenomenal, agradável, gentil e acessível, por me incentivar a buscar sempre mais e me proporcionar todo suporte para avançar em minha carreira, desde minha iniciação científica e no mestrado, permitindo meu crescimento profissional. Além de sempre torcer e me apoiar muito. Sempre me tratando de forma ímpar. Saiba que tudo isso foi de extrema importância para que eu pudesse conquistar muita coisa em minha vida! O senhor é uma pessoa e profissional a quem admiro incondicionalmente. Serei eternamente grata ao senhor.

Á Profa. Dra. Janaina Habib Jorge que também participou como co-orientadora, agradeço de coração por ter aceitado e por tudo que fez para me ajudar nesta pesquisa, transmitindo seus valiosos conhecimentos. E por me acolher tão bem no laboratório no qual fiz a parte celular. Serei eternamente grata, pelos cafés, pelo convívio e por tudo.

Á Paula Barbugli que participou muito deste trabalho. Você esteve sempre junto comigo, me ajudando muito, e em tudo, desde o delineamento do projeto até a execução. Agradeço imensamente sua ajuda e por dividir comigo seus conhecimentos. Pelo convívio e pelas longas e prazerosas conversas. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Gelson, obrigada por colaborar nesta pesquisa, e por toda a ajuda, suporte e conhecimento. Pela maravilhosa convivência e aprendizado nestes anos. Muito Obrigada Prof. Gel.

Ao Prof. Dr. Miguel Jafellici professor do Departamento de Físico Química da Faculdade de Química de Araraquara – UNESP, por ajudar e permitir a execução da energia livre de superfície no Goniômetro que fica no laboratório pelo qual é o professor responsável, desde meu mestrado e neste momento do doutorado. Agradeço pelos conhecimentos divididos e pela possibilidade de usar o equipamento e por ter me cedido alguns líquidos para esta análise.

Á Danúbia Cristina Gava, responsável técnica pelo equipamento de análise da Difração de Raio x do Instituto de Química de Araraquara - UNESP, que realizou a análise pelo equipamento e que gentilmente me ajudou.

Á Luciana Assirati Casemiro e Carlos Henrique Martins pela possibilidade de complementar meu trabalho com a valiosa ajuda de vocês na parte de adesão de microrganismos executada na Universidade de Franca (UNIFRAN), além de um excelente convívio. Vocês foram essenciais! Tem minha gratidão e respeito eternos. Agradeço imensamente por tudo.

Á Maria Anita Vasconcelos Ambrosio, técnica que me ajudou com a adesão de microrganismos no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA). Sempre tão gentil e com uma energia boa demais! Adorei aprender e conviver com você!

A Universidade de Franca (Unifran) e ao Prof Omar Lima que realizou as análises da morfologia celular microscópio eletrônico de varredura VEGA 3 TESCAN na Universidade de Franca (UNIFRAN).

Ao Renan de Lima Faria (“Bonito”), meu parceiro, Muito obrigada! Muito difícil descrever resumidamente o que sinto, mas gosto do que sinto ao seu lado, acredito que um bom resumo seria amor e felicidade! Sou muito feliz com você, e amo nossa “família”, nós dois juntos com a Lola (“Cão-canino”)! Vocês são meu lar e amor! Minha energia boa! Muito Obrigada por tudo! TE AMO!

E aos meus sogros, Iara de Lima Faria e João Bosco Faria, que me acolheram em sua linda família com muito amor e fraternidade sem igual! Vocês são incrivelmente sensacionais! Muito Obrigada por tudo!

Ao meu Tio João Hespanholo, Tia Martha Maria Palone Hespanholo, a filha deles Luciana, aos filhos desta (“Meus sobrinhos”) Nicolas e Giovana, seu esposo Davi; a Carla, Gerson, Hanna e Kate, um amor incondicional de família, todos vocês formam uma família que é meu exemplo. Obrigada por sempre estarem comigo, mesmo fisicamente tão distante. Amo vocês demais! Saudades infinitas!

AGRADECIMENTOS... serão muitos!

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, na pessoa da Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato e do Vice-diretor Prof. Dr. Edson Campos, pela oportunidade a mim proporcionada.

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP representados pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho, e Vice-Chefe Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior, pela possibilidade de realizar este trabalho e por tudo.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP representados pela coordenadora Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina e vice coordenadora Profa. Dra. Renata Garcia Fonseca, pelo suporte para a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes pela bolsa de estudos a mim concedida que foi muito importante financeiramente.

Ao Programa de Apoio à Pós-Graduação – UNESP (Proap) pela ajuda em alguns custos da pesquisa, que foram imprescindíveis para a execução da pesquisa.

À Conexão Sistemas de Próteses Ltda., SP, Brasil, pela doação dos discos de titânio e zircônia. Agradeço imensamente vocês viabilizaram a execução do meu projeto de doutorado e não tenho palavras para agradecer. Não posso deixar de mencionar aqui a Profa. Dra. Thalitta Pereira Queiroz e ao César A. Campaneri.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) pela esterilização com radiação gama dos discos do grupo não envelhecido.

À Érica Dorigatti de Ávila. Mais uma vez venho aqui agradecer a você. Admiro muito você. Desde minha iniciação científica e em meu mestrado aprendi a delinear e desenvolver um projeto, com sua ajuda e ensinamentos. Agradeço imensamente todo o suporte, ajuda, conhecimento dividido, desde a graduação e por toda a minha pós-graduação. E neste trabalho com parte da estatística. Obrigada também por sua amizade, você é muito especial. Sempre estarei contigo.

À Fernanda Basso Gonçalves, que além de ser uma pessoa muito especial, por quem tenho grande carinho imenso, contribuiu muito para este trabalho. Agradeço sua preciosa ajuda na execução do projeto e nos momentos em que precisei tirar dúvidas.

À Camila Cristina de Foggi e Jéssica Bernegossi, agradeço primeiro pela amizade, cada uma de vocês é muito importante e mora em meu coração, mas também por toda a ajuda com os programas que salvaram a vida no doutorado com algumas análises que consegui fazer, e por tanto que seria demais descrever, mas

pelo apoio. Vocês são demais e muito especiais. Apesar de conhecer vocês de formas diferentes, hoje uma me lembra a outra, pela amizade e parceria, que tem entre vocês, e comigo! Camila, que foi minha companheira de uma incrível e inesquecível viagem internacional, na qual ficamos mais próximas! Jéssica, farmácia, dentes bovinos, assim gravada nos contatos de meu celular e por isso nos conhecemos, ainda bem! Muito Obrigada!

À Bruna Natalia Alves da Silva Pimentel que durante a parte experimental me ajudou muito, desde o início da adesão celular me ajudou e dividiu seus preciosos conhecimentos comigo, me deixando muito mais segura. Além da prazerosa convivência.

À Profa. Dra. Carina Domaneschi que gentilmente pegou os corpos de prova que foram esterilizados no Ipen em São Paulo. E por ser uma pessoa tão gentil, dedicada e competente com a qual pude conviver por alguns dias, estes que fiquei hospedada em sua casa para começar meu treinamento com células.

Aos Professores da Disciplina de Prótese Total, João Neudenir Arioli Filho, Sérgio Sualdini Nogueira ("Sual"), Ana Carolina Pero, Marco Antonio Compagnoni pelo respeito e amizade com que sempre me trataram. Além do incentivo a buscar sempre mais e pelo apoio durante todo o mestrado e agora no doutorado.

A todo o corpo docente do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, pelo carinho com que me ensinaram e transmitiram sem restrições o valioso conhecimento. Mais do que somente Odontologia. Serei eternamente grata. Meu reconhecimento, gratidão e desejo de que Deus lhes abençoe. Aos professores de Prótese Parcial Fixa, José Cláudio Martins Segalla, José Maurício dos Santos Nunes Reis, Lígia Antunes Pereira Pinelli, Regina Helena Barbosa Tavares da Silva. Aos professores de Prótese Parcial Removível, Ana Lucia Machado, Ana Cláudia Pavarina, Carlos Eduardo Vergani, Eunice Teresinha Giampaolo, Ewerton Garcia de Oliveira Mima, Janaina Habib Jorge. Às professoras de Oclusão e DTM, Cinara Maria Camparis e Daniela Aparecida Godoi Gonçalves. Aos professores de Materiais Dentários, Gelson Luis Adabo, Carlos Alberto dos Santos Cruz, Renata Garcia Fonseca, e Luis Geraldo Vaz.

Ao Prof. Dr. Sérgio Russi, fica sempre difícil falar do senhor, ou sobre o quanto foi importante em minha vida. Minha paixão pela reabilitação oral foi despertada em uma aula de slides antigos que eram colocados em dois suportes em ordem que o senhor ministrou sobre estética e cosmética em prótese total. Sua presença na faculdade, suas conversas, sempre fizeram meus dias melhores. Obrigada por ser este exemplo em dedicação, humildade, educação, ensino e de que o conhecimento pode nos levar por um caminho de vida pleno e feliz. Tenho grande admiração pelo senhor. Que deus lhe abençoe e lhe dê muita saúde.

À Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato que desde meu TCC na graduação me incentivou muito a buscar a carreira acadêmica, além de ser uma pessoa muito especial, por quem tenho imensa admiração, eterno carinho e gratidão. Que sempre me ajudou quando fui recorrer a sua ajuda! Pelas nossas conversas!

Aos professores da Clínica Integrada, Prof. Dr Maurício Meirelles Nagle, Profa. Dra. Ana Cláudia Gabrielli Piveta, Prof. Dr Weber Adad Ricci, Prof. Dr Oscar Fernando Muñoz Chávez, Prof. Dr Luiz Antônio Borelli Barros, Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon, onde fiz estágio docência e por me receberem e me ensinarem muito mais que odontologia. Cada um de vocês me ensinou muito. Também agradeço aos funcionários Elisete Ester Venâncio, Glaucia Cristina Figueira Merlos, Isabel Cristina da Silva Morelli, Alessandro Carezia, Neli Sandra Aparecida de Oliveira Parreira, pelo excelente convívio e ajuda em vários momentos.

Profa. Dra. Ana Cláudia Gabrielli Piveta e Prof. Dr Oscar Fernando Muñoz Chávez pela indicação para o início de minha carreira docente na Unifran, que foi afirmada pela Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior! Sou eternamente grata a vocês!

Prof. Dr. Luiz Antônio Borelli Barros que por muitas vezes colaborou com associação em casos clínicos e estes apresentados em congressos, com os quais em diversos ganhamos prêmios de apresentação! O senhor é “Show! Copacabana”, um amor pela docência que é admirável, um carisma sem igual!

Ao laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP pelos anéis metálicos cedidos para o plantio das células, em nome do Prof. Carlos Alberto de Souza Costa (responsável pelo laboratório) e Fernanda Gonçalves Basso.

A todos aqueles da minha família que acompanharam de pertinho todos esses anos me apoiando e sendo presentes em minha vida, Simone, Rafael, Tia Cleide, Tio Milton, Tia Fátima, Tio Cri, Gabrielzinho, Cintia.

Às minhas amigas de infância Isabela Miranda Carmona, Bruna Cardoso Brasil de Souza, Stela Basso Montoro, Marina Canto de Souza, Fernanda Bombardi, Fábio Rocha (Bo) com as quais pude contar para dividir todos os momentos da minha vida, tanto pessoais como profissionais e não somente durante meus anos de pós-graduação, mas desde meus 7 anos de idade, tantas histórias nas quais tiveram risos, choros, brigas, reconciliações, e uma infinidade de emoções. Meu amor por vocês é incondicional, desde sempre e para sempre. Agradeço pela vida toda!

Às minhas amigas de graduação Marina Bozzini Paies e Renata Pereira Êstrela, por me mostrarem que a distância não afasta verdadeiras amizades e por me ajudarem nas horas em que precisei.

A Alessandra Lirango Castro Micheletti e sua família linda, Laurinha e João que com sua amizade estiveram em momentos importantes desta minha trajetória. Vocês são muito especiais!

Cibele Oliveira de Melo Rocha pela convivência sempre tão prazerosa, e com quem vivi momentos de vida e profissionais de grande troca e intensidade, você é demais amiga! Seu casamento com o Diogo Longhini, me fez acreditar no amor!

À Sabrina Maria Castanharo pelo apoio e amizade de sempre, por estar ao meu lado, por sempre me apoiar e dividir muitas coisas comigo, desde a minha iniciação e até hoje. Você é muito especial e nossa amizade é muito importante para mim. Muito Obrigada.

À um grupo de amiga que ficou muito forte apesar da distância física de algumas! Bruna Fernandes Moreira Alfenas pela amizade de sempre que mesmo com a distância, nada mudou. Você é demais linda por fora e por dentro, mesmo com uma super blindagem. BA amo você. À Ana Lúcia Roselino Ribeiro pela amizade conquistada, pelo convívio mesmo à distância, aprendi muito com você. Infelizmente temos uma distância física, mas que nada impediu que estivéssemos sempre próximas. Sempre me identifiquei muito com você e com seu jeito sincero de ser. À Beatriz Panariello, pelas conversas no grupo do whatsapp, que além da amizade, me fizeram dar boas risadas. E à Camila Cruz Lorenzetti, Loren a RP da odonto FOAr-UNESP, excelente dentista, uma pessoa que tem um coração enorme, que não sabe dizer não a nada e nem ninguém, que fala mais que eu.

À Sílvia Helena Bernardi Mollo e sua família (Beatriz, Luisa) que sempre me receberam com carinho, alegria e amor em sua casa e por quem tenho imenso carinho! Vocês são uma família que admiro demais! Muito Obrigada!

À Carolina Mollo Binda pela amizade, companheirismo, e pelas conversas animadas e pelo conhecimento que dividiu comigo. Além de me incentivar sempre. Você é demais amiga. Obrigada por sempre estar ao meu lado, por tudo que fez e faz por mim. Você é uma parceira na vida e profissão. Admiro demais você. Uma profissional dedicada e determinada, com quem aprendo demais a cada dia. Muito obrigada por tudo. Sempre estarei contigo. Amo você!

A todos os meus colegas de Doutorado e alunos da pós-graduação por todos os momentos divididos durante esses anos e por estarem dividindo comigo esta trajetória: Gabriela Giro, Gabriela Polli, Gabriel Hatanaka, Kátia Vieira Cardoso, Paula Cristina Jordani, Norberto Martins Samira Branco Martins, Raphael F. S. B. Araújo de Oliveira Junior, Diogo Longhini, Fernanda Alves, Lucas Miguel Candido Danny Omar Mendonza Marin, Camila Cristina de Foggi, Cibele Oliveira de Melo Rocha, Claudia Viviane Guimarães Pellissari, Aion Mangino Messias, Guilherme Ibeli, Ester Bordini, Carla Duque, Taisa Pisani, Carmélia Lobo, Jeff, Vivian, Jacqueline Zucolotto, Guilherme Braidó, Lucas Portela, Vinicius Sakima, Gabriela Alonso, Camila Jabr,

Bruna Vallerini, e todos aqueles que fazem e fizeram pós graduação no programa de Reabilitação Oral que com dedicação me ajudaram a estar num programa de excelência.

As alunas de iniciação que co-orientei Débora Monteiro de Lima, Leticia Kitagawa, Marina Rosa Delgado Reis e com quem pude trocar conhecimentos e muitos me fizeram dedicatórias que me emocionaram em seus TCCs.

Débora Monteiro de Lima (“Gata Garota”) amiga com quem tive o prazer de dividir muito mais que momentos de laboratório, você é muito especial para mim.

Aos meus companheiros e amigos do Laboratório Co-Cultura de Células Faculdade de Odontologia de Araraquara pelos momentos que vivemos no laboratório e o prazer de aprendermos juntos. Em especial a Ligia Sabino e Luana Sales.

Agradei a você Cadu na minha dissertação de mestrado, mas agora continuo a agradecer (*in memoriam*) pelo exemplo de dedicação e companheirismo que você foi dentro da pós-graduação. Jamais me esquecerei as várias vezes que me ajudou no laboratório, de forma tão gentil. Você faz falta.

Ao Raphael Ferreira de Souza Bezerra Araujo (Rapha). Você é uma pessoa especial, com tive o prazer de conviver, e agradeço infinitamente por toda a sua ajuda em tantos projetos e tantas coisas que ficaria muito extenso colocar aqui, além claro de uma parceria muito boa. Aprendi demais com você. #teamkiko rsrs. Muito Obrigada por tudo!

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese Martinha, Miriam, Adelaide, Adelaide (Adelaidinha), Dulce, Júnior, Fernando e Lucas pela prestatividade e alegria com que sempre me trataram, pela linda e prazerosa convivência, pelos cafés, brincadeiras e conversas. Com certeza a execução desse estudo e minha permanência na pós-graduação se tornou mais agradável com vocês por perto!

Aos funcionários da seção de pós-graduação, Jose Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier pela gentileza com que sempre me trataram e preocupação em ajudar a resolver qualquer problema, além da prestatividade de sempre.

A todos os funcionários da biblioteca Ana Cristina e Marley pela atenção e durante uma tarde muito agradável. Ana obrigada pela ajuda e paciência e me ajudar.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP e incluo àqueles que são terceirizados. Obrigada pelo apoio, carinho, dedicação, e maravilhosa convivência durante todos os anos de graduação e pós-graduação. Sem vocês nada seria possível!

Aos meus colegas da UNIFRAN, Soraia Marangoni, Luciana Assirati Casemiro, Antônio de Luna Malheiros Segundo, Antonio Carlos Pereira Gomes, Marcia Cristina Alvarez, Fabio Afrânio de Aguiar Junior, Lilian Tedeschi, Maria Renata Abrão Camillo Rodrigues, Gizela Faleiros, Viviane Rodrigues Vilela, Fabio Picoli, Frederico Bordini Chaves Faleiros, Alice Bolliger Maniglia, Bruno Toledo, Alice Dias Petri, Egmont Azevedo Das Chagas, Romeu Felipe Elias Calixto, Carlos Henrique Gomes Martins, Omar José de Lima, Erick Ricardo Silva, Patrícia Laguna Roselino (que me ensinou a usar o Endnote) com quem tive o imenso prazer e honra de conviver! Sou imensamente grata por tudo pela oportunidade de dar aula na UNIFRAN, ao lado de grandes mestres a quem admiro grandemente; por ter conhecido cada um e por terem feito parte da minha vida profissional e pessoal! Aprendi tanto com cada um de vocês! Foi uma honra! Muito Obrigada!

Marcela Almeida Gonçalves, por todas as viagens, conversas, risadas, enfim por tudo! Você é uma irmã mais velha e por quem tenho muita admiração e carinho! Desejo muitas bênçãos e tudo de melhor sempre em sua vida! Sempre que precisar poderá contar comigo!

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada de coração.

SUPER OBRIGADA.

“Se você pode sonhar, você pode realizar.”
Walt Disney

Rigolin MSM. Influência do envelhecimento de *abutments* de titânio e zircônia na adesão, viabilidade e proliferação celular, e adesão de biofilme multiespécie [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

A longevidade dos implantes dentários depende da manutenção do tecido peri-implantar e da ausência de inflamação nessa área. Semelhante aos dentes, as bactérias patogênicas podem aderir nas superfícies dos *abutments* dos implantes e causar doença peri-implantar. As propriedades físico-químicas intrínsecas a cada material ao longo do tempo podem sofrer alterações e assim afetar a adesão devido a constante renovação celular e ao desenvolvimento do biofilme. Avaliar a influência do envelhecimento de materiais de *abutment* de titânio (Ti) e zircônia (ZrO₂) na viabilidade, morfologia, adesão e proliferação de biofilmes de ceranócitos orais normais (Nok-si) e biofilme multiespécie *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguinis* e *Fusobacterium nucleatum*. Nos discos de ZrO₂ e Ti foram analisados rugosidade superficial (Ra), ângulo de contato com a água e difração de raios X (DRX), antes e após o envelhecimento em autoclave. A viabilidade celular de Nok-si foi avaliada pelo ensaio de MTT e a morfologia foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A proliferação celular e a adesão foram analisadas usando microscópio confocal. Biofilme multiespécies foram analisados quantitativamente por Log (UFC/mL) e qualitativamente por MEV. Para Ti, diferença estatisticamente significativa foram encontradas entre as medidas de rugosidade antes e depois do processo de envelhecimento, entretanto o processo de envelhecimento não afetou a rugosidade média dos discos de ZrO₂. O processo de envelhecimento afetou a molhabilidade da superfície do Ti quando em contato com água e polietilenoglicol, para a superfície do ZrO₂ quando em contato com etilenoglicol e polietilenoglicol ($p < 0,05$). A fase tetragonal diminuiu, e houve aumento da fase monoclínica na ZrO₂, e não houve alterações no Ti. Viabilidade e morfologia celular não apresentaram diferenças para as duas superfícies antes e após o envelhecimento. A adesão e proliferação celular e a quantidade de β -actina presente nas células foram maiores no Ti. Menor adesão de biofilme na superfície de Ti. Concluiu-se que adesão e proliferação de queratinócitos normais orais e a viabilidade e adesão do biofilme foram influenciados pelo tipo de material e pelo processo de envelhecimento. Os resultados indicam que os materiais examinados são adequados como *abutments*, porém O Ti mostrou melhor adesão e proliferação celular e menor adesão de biofilme.

Palavras-chave: Titânio. Cerâmica. Envelhecimento. Adesão celular. Bactérias.

Rigolin MSM. Influence of aging of titanium and zirconia abutments on adhesion, viability and cell proliferation, and adhesion of multispecies biofilm [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The longevity of dental implants depends on the maintenance of the peri-implant tissue and the absence of inflammation in that area. Similar to teeth, pathogenic bacteria may adhere to the surfaces of implant abutments and cause peri-implant disease and consequently implant loss. The physico-chemical properties intrinsic to each material over time may undergo changes and thus affect adhesion due to constant cell turnover and biofilm development. To evaluate the influence of aging of titanium and zirconia abutment materials on the viability, morphology, adhesion and proliferation of normal oral keratinocytes biofilms (Nok-si) and multispecies biofilm *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguinis* and *Fusobacterium nucleatum*. Surface roughness (Ra), water contact angle and X-ray diffraction (XRD) were analyzed on the zirconia (ZrO₂) and titanium (Ti) discs before and after autoclaving aging. Nok-si cell viability was assessed by the MTT assay and the morphology was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Cell proliferation and adhesion were analyzed using confocal microscopy. Multispecies biofilm were quantitatively analyzed by Log (CFU/mL) and qualitatively by SEM. For Ti, a statistically significant difference was found between the roughness measurements before and after the aging process, however the aging process did not affect the average roughness of the zirconia discs. The aging process affected the wettability of the Ti surface when in contact with water and polyethylene glycol, and to the ZrO₂ when in contact with ethylene glycol and polyethylene glycol ($p < 0.05$). The tetragonal phase decreased, and there was an increase of the monoclinic phase in the ZrO₂, and there were no changes in Ti. Viability and cellular morphology did not present differences for the two surfaces before and after aging. Cell adhesion and proliferation and the amount of β -actin present in the cells were higher in Ti. Lower biofilm adhesion on Ti surface. It was concluded that adhesion and proliferation of normal oral keratinocytes and viability and biofilm adhesion were influenced by the type of material and the aging process. The results indicate that the materials examined are suitable as abutments, but Ti showed better cell adhesion and proliferation and lower biofilm adhesion.

Keywords: Titanium. Ceramics. Aging. Cell Adhesion. Bacteria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 PROPOSIÇÃO	23
3 REVISÃO DA LITERATURA	24
4 MATERIAL E MÉTODO.....	35
4.1 Envelhecimento.....	35
4.2 Análise das Superfícies	36
4.2.1 Medida da rugosidade superficial (Rugosímetro).....	36
4.2.2 Medida da energia livre de superfície.....	37
4.2.3 Difração de raios-X (DRX).....	40
4.3 Análise da Adesão, Viabilidade e Proliferação Celular.....	41
4.3.1 Descongelamento das células	41
4.3.2 Cultivo das células NOK-si.....	42
4.3.3 Adesão celular Nok-si.....	42
4.4 Avaliação da Viabilidade Celular (MTT)	42
4.5 Análise da Morfologia Celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
4.6 Análise de Proliferação Celular com Carboxifluoresceína (CFSE).....	44
4.7 Análise da Adesão Celular (Nok-si) por Microscopia..... de Fluorescência	45
4.8 Adesão de Microrganismos.....	45
4.8.1 Biofilme multiespécie <i>Pg</i> + <i>Fn</i> + <i>Ss</i>	46
4.9 Quantificação do Biofilme por Contagem UFC/mL.....	46
4.10 Análise da Morfologia Biofilme Aderido por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	47
4.11 Análise Estatística.....	47
5 RESULTADO	48
5.1 Análise das Superfícies.....	48
5.2 Avaliação da Viabilidade Celular (MTT) Nok-si	51
5.3 Análise da Morfologia Celular (Nok-si) por MEV	52

5.4 Análise de Proliferação Celular com CFSE	54
5.5 Análise da Adesão Celular (Nok-si) por Microscopia de Fluorescência	56
5.6 Quantificação do Biofilme por Contagem UFC/mL	58
5.7 Análise da Morfologia Biofilme Aderido por MEV	59
 6 DISCUSSÃO	 61
 7 CONCLUSÃO	 67
 REFERÊNCIAS	 68

1 INTRODUÇÃO

Após o surgimento da osseointegração, o tratamento com implantes osseointegrados tornou-se uma realidade na clínica odontológica, dessa forma, a taxa de sucesso e insucesso dos implantes passou a ter uma importância significativa, pois todo o tratamento se baseia na possibilidade de se obter a osseointegração dos implantes e da permanência desta ao longo do tempo¹⁻⁴.

A substituição de um dente perdido por uma única coroa suportada por implante tem ganhado cada vez mais popularidade tanto pelos médicos quanto pelos pacientes⁵. Estudos clínicos de longo prazo mostraram excelentes taxas de sobrevivência para a substituição de um único implante⁶. Contudo, o sucesso de um tratamento com implantes não depende apenas da osseointegração bem-sucedida do implante, mas também da supra-construção protética, isto é, o complexo implante-*abutment*-coroa tem de se misturar naturalmente com o tecido peri-implantar circundante e o resto da arcada dentária^{3,7}.

Assim, a integridade da área peri-implantar é fundamental, mesmo com uma osseointegração satisfatória, e é determinante para sucesso clínico final dos implantes⁸. O contato direto entre o implante e o osso subjacente, assim como a ausência de processo inflamatório são necessários para a longevidade dos implantes dentais⁹. De acordo com a literatura científica, a inflamação dos tecidos peri-implantares é, atualmente, considerada um dos principais responsáveis pela perda dos implantes¹⁰⁻¹³.

Diversos microrganismos capazes de desenvolver doenças, como a periodontite e, na presença de implantes, a peri-implantite estão presentes na cavidade oral¹⁴. Após a perda dos dentes causada pela doença periodontal, os microrganismos permanecem sobre as estruturas remanescentes na cavidade oral e influenciam diretamente a colonização dos implantes, instalados a posteriori, mesmo após a osseointegração ter ocorrido com sucesso^{13,15}.

A fim de evitar a penetração bacteriana, que poderia prejudicar tanto a cicatrização inicial quanto o comportamento em longo prazo dos implantes, há a formação de uma barreira epitelial efetiva capaz de proteger biologicamente as estruturas peri-implantares^{16,17}.

Em um dente natural, as fibras colágenas dento-gengivais estão firmemente inseridas no cimento e no osso, e orientadas perpendicularmente ou em direção

oblíqua em relação à superfície do dente, atuando como uma barreira à migração do epitélio e impedindo a invasão bacteriana^{18,19}. Em contraste, os implantes não possuem cimento: a orientação das fibras de 'ligação' no tecido mole superior a crista óssea é paralela à superfície do implante e, mais importante, não são inseridas na superfície do mesmo^{20,21}. Como consequência, há uma fraca resistência mecânica de adesão do tecido conjuntivo ao implante quando comparada com a dos dentes naturais²².

Nos dias de hoje, as taxas de sucesso dos implantes osseointegrados passam dos 90%, mas mesmo assim é de extrema importância que os fatores que causam o insucesso sejam minimizados ao máximo, tornando o tratamento com implantes ainda mais previsível, eficaz e duradouro, como por exemplo a escolha correta para materiais de *abutments*³.

Os materiais utilizados para a confecção de *abutments* são o titânio comercialmente puro (Ti) e atualmente a zircônia (ZrO₂). O primeiro ainda é considerado padrão-ouro, já a zircônia (ZrO₂), aparece para substituir o Ti em área estética, principalmente em presença de gengiva fina e pouco queratinizada^{7,23,24}.

Para materiais de implantes, quando se considera metais e ligas metálicas, até o presente momento, somente o Ti comercialmente puro e a liga de Titânio-Alumínio-Vanádio (Ti₆Al₄V) apresentam respaldo científico descrito na literatura odontológica comprovando seu sucesso clínico para uso em Implantodontia. O Ti apresenta como vantagens, o relativo baixo custo quando comparado a metais nobres, grande estabilidade química da camada superficial de óxidos (TiO, TiO₂, Ti₂O₃) que é formada quando do corte da peça de Ti e sua exposição ao oxigênio do ar, além de sua comprovada biocompatibilidade²⁵.

Além do Ti, a ZrO₂ surge como alternativa bastante promissora como material de *abutment* devido à, primeiramente, os *abutments* de ZrO₂ podem ser utilizados até mesmo em regiões posteriores devido à sua alta resistência mecânica e flexural. Em segundo lugar, muito embora o uso de *abutments* de Ti não seja contraindicado, a cor dos *abutments* ZrO₂ é semelhante ao dente natural conferindo-as excelentes propriedades estéticas⁷.

Diferentes materiais de superfície do *abutment* também podem influenciar a resposta do tecido peri-implantar duro e mole. Consequentemente, a composição química e as propriedades físicas da superfície do *abutment* podem afetar o comportamento de tecidos peri-implantares. Como por exemplo a rugosidade

superficial (Ra) e a energia livre de superfície (ELS), que podem desempenhar um papel importante em relação à adesão celular influenciando no espalhamento das células sobre a superfície^{8,26}.

Porém os *abutments* e implantes fornecem uma superfície para colonização microbiana²⁷. Estudos sobre a microbiota relacionada ao implante mostram que a bactéria sub e supragengival do implante é originalmente derivada da microbiota da cavidade bucal^{3,15,28-31}. Os patógenos periodontais oportunistas, como *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Streptococcus sanguinis* (Ss) entre outros foram associados com peri-implantite e falha de implantes³².

Um dos fatores para o sucesso dos implantes dentais é a manutenção dos tecidos saudáveis em volta deles. O acúmulo de biofilme sobre o *abutment* e na cavidade bucal induz a uma inflamação nos tecidos ao redor desse implante e pode levar a uma progressiva destruição (peri-implantite) e à falha completa do tratamento com implante, quando há a perda da osseointegração³³.

Entretanto, no meio bucal o material instalado sofre alterações. Ambos os materiais diferem em muitos aspectos e têm suas próprias vantagens e desvantagens. O Ti oferece vantagens com relação a densidade, biocompatibilidade, a capacidade de se reparar instantaneamente se danificado devido à camada de óxido passivante e a resistência a ataques ácidos. No entanto, a cor cinza do Ti pode brilhar através da fina mucosa, especialmente se aplicada na região anterior^{4,34}. Além disso, apenas as ligas de Ti mais recentes são caracterizadas por um módulo de elasticidade próximo ao osso humano³⁵, e alguns estudos relataram reações galvânicas ocorridas após o contato com saliva e flúor. A resposta inflamatória e a reabsorção óssea também foram induzidas por partículas de Ti^{4,36}. Já a ZrO₂, sofre degradação de superfície em ambiente bucal devido a presença de água ou vapor^{37,38}, chamada de degradação a baixa temperatura (DBT) ou Low Temperature Degradation (LTD) podendo também influenciar na resistência mecânica do material, além de sofrer alterações na rugosidade superficial^{39,40}. Outro aspecto importante a ser considerado com relação aos *abutments* de ZrO₂ é sua suscetibilidade aos mecanismos de fadiga, limitação crítica dos materiais cerâmicos, uma vez que, o crescimento subcrítico de trincas pode resultar em decréscimo da resistência e longevidade das restaurações⁴¹.

A literatura científica apresenta informações limitadas para o desempenho biológico de materiais para *abutment*^{42,43}, com poucos estudos avaliando a qualidade

da adesão celular e de microrganismos nestes componentes protéticos⁴⁴ após envelhecimento. Estudos de colonização bacteriana ao redor de *abutments* de Ti e ZrO₂ mostraram resultados conflitantes. Ao mesmo tempo, a presença de uma efetiva barreira tecidual ao redor dos implantes osseointegrados é de suma importância para saúde e longevidade dos implantes, mantendo-se desta maneira mesmo com o passar do tempo, apesar das alterações na superfície dos materiais e renovação celular constate.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, concluiu-se que adesão e proliferação de queratinócitos normais orais e a viabilidade e adesão de *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguinis* e *Porphyromonas gingivalis* foram influenciados pelo tipo de material e pelo processo de envelhecimento. Os resultados indicam que os materiais examinados são adequados como *abutments*, porém O Ti mostrou melhor adesão e proliferação celular e menor adesão de biofilme.

Observamos também que:

- O processo de envelhecimento não afetou a rugosidade média da ZrO₂ porém afetou a rugosidade do Ti;
- O processo de envelhecimento afetou a molhabilidade da superfície de Ti quando em contato com água e polietilenoglicol e para a ZrO₂ afetou a molhabilidade da superfície quando em contato com etilenoglicol e polietilenoglicol. A energia livre de superfície foi numericamente maior para a ZrO₂, porém o Ti tornou-se mais hidrofóbico e lipofílico;
- Houve mudança de fase tetragonal para monoclinica na ZrO₂, enquanto que no Ti não houve alteração;
- A viabilidade e a morfologia dos queratinócitos normais orais não foram influenciadas pelo tipo de material ou pelo envelhecimento;
- A proliferação celular e a quantidade de β -actina presente nas células foram maiores no Ti (não envelhecido e envelhecido);
- Observou-se menor viabilidade e adesão de biofilme no Ti (não envelhecido e envelhecido).

REFERÊNCIAS*

1. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol* 2000. 2002; 30: 70–8.
2. 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 Impl Res*. 2008; 19(11): 1178-87
3. Avila ED, de Molon RS, Vergani CE. The relationship between biofilm and physical-chemical properties of implant abutment materials for successful dental implants. *Materials (Basel)*. 2014; 7(5): 3651-62.
4. Apratim A, Eachempati P, Salian KK, Singh V, Chhabra S, Shah S. Zirconia in dental implantology: a review. *J Int Soc Preventive Community Dent*. 2015; 5(3): 147-156.
5. Jokstad A, Braegger U, Brunski JB, Carr AB, Naert I, Wennerberg A. Quality of dental implants. *Int Dent J*. 2003; 53(6 Suppl 2): 409-43.
6. Maló P, de Araújo Nobre M, Lopes A, Ferro A, Gravito I. Single-tooth rehabilitations supported by dental implants used in an immediate-provisionalization protocol: report on long-term outcome with retrospective follow-Up. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015; 17(Suppl 2): e511-9.
7. Glauser R, Sailer I, Wohlwend A, Studer S, Schibli M, Scharer P. Experimental zirconia abutments for implant-supported single-tooth restorations in esthetically demanding regions: 4-year results of a prospective clinical study. *Int J Prosthodont*. 2004; 17(3): 285–90.
8. Jansen JA, Den Braber ET, Walboomers XF, De Ruijter JE. Soft Tissue and Epithelial Models. *Adv Dent Res*. 1999; 13: 57-66.
9. 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*. 2005; 74(1): 12–22.
10. 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: 292–6.
11. Pier-Francesco A, Adams RJ, Waters MG, Williams DW. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17(6): 633-7.

* 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>

12. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW, et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008; 23(2): 327–34.
13. Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin. Oral Impl. Res*. 2009; 21: 156–64.
14. Dorkhan M, Paz LEC, Marie Skepö M, Svensäter G, Davies JR. Effects of saliva or serum coating on adherence of *Streptococcus oralis* strains to titanium. *Microbiology*. 2012; 158(Pt 2), 390–97.
15. Avila ED, Vergani CE, Junior FAM, 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): 481-7.
16. Glauser R, Peter Schupbach P, Gottlow J, Hammerle CHF. Periimplant soft tissue barrier at experimental one-piece mini-implants with different surface topography in humans: a light-microscopic overview and histometric analysis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2005; 7(1): 44-51.
17. Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AEF, 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 Impl Res*. 2006; 17 (Suppl. 2): 55–67.
18. Stern IB. Current concepts of the dentogingival junction: the epithelial and connective tissue attachments to the tooth. *J Periodontol*. 1981; 52(9): 465–76.
19. Damek-Poprawa M, Korostoff J, Gill R, DiRienzo JM. Cell junction remodeling in gingival tissue exposed to a microbial toxin. *J Dent Res*. 2013; 92(6): 518-23.
20. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res*. 1991; 2(2): 81–90.
21. Buser D, Weber HP, Donath K, Fiorellini JP, Paquette DW, Williams RC. Soft tissue reactions to non-submerged unloaded titanium implants in beagle dogs. *J Periodontol*. 1992; 63(3): 225–35.
22. Hermann JS, Buser D, Schenk RK, Schoolfield JD, Cochran DL. Biologic Width around one- and two-piece titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12(6): 559–71.
23. Yildirim M, Edelhoff D, Hanisch O, Spiekermann H. Ceramic abutments-a new era in achieving optimal esthetics in implant dentistry. *Int J eriodontics Restorative Dent*. 2000; 20(1): 81-91.
24. Nakamura K, Kanno T, Milleding P, Örtengren U. Zirconia as a dental Implant abutment material: a systematic review. *Int J Prosthodont*. 2010; 23: 299–309.
25. Steinemann SG. Titanium – the material of choice? *Peridontol*. 1998; 17: 7-21.

26. Linkevicius T, Apse P. Influence of Abutment Material on Stability of Peri-implant Tissues: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008; 23: 449–56.
27. O'Mahony A, Macneill S, Cobb C. Design features that may influence bacterial plaque retention: a retrospective analysis of failed implants. *Quintessence Int*. 2000; 31: 249-56.
28. Heimdahl A, Kondell PA, Nord CE, Nordenram A. Effect of insertion of osseointegrated prosthesis on the oral microflora. *Swed Dent J*. 1983; 7: 199-204.
29. Avila ED, de Molon RS, Palomari Spolidorio DM. Implications of surface and bulk properties of abutment implants and their degradation in the health of periodontal tissue. *Materials*. 2013; 6: 5951-66.
30. Avila ED, Avila-Campos MJ, Vergani CE, Spolidório DMP, de Assis Mollo Jr F. Structural and quantitative analysis of a mature anaerobic biofilm on different implant abutment surfaces. *J Prosthet Dent*. 2016; 115: 428-36.
31. Avila ED, De Molon RS, Lima BP, Lux R, Shi W, Junior MJ, et al. Impact of physical chemical characteristics of abutment implant surfaces on bacteria adhesion. *J Oral Implantol*. 2016; 42: 153-8.
32. Leonhardt A, Olsson J, Dahlen G. Bacterial colonization on titanium, hydroxyapatite and amalgam surfaces in vivo. *J Dent Res*. 1999; 74: 1607-12.
33. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci*. 1998; 106(3): 721-64.
34. Andreiotelli M, Kohal RJ. Fracture strength of zirconia implants after artificial aging. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009; 11: 158-166.
35. Guo S, Q. Meng, X. Zhao, Q. Wei, H. Xu. Design and fabrication of a metastable β -type titanium alloy with ultralow elastic modulus and high strength. *Sci. Rep*. 2015; 5: 14688.
36. Kohal RJ, Knauf M, Larsson B, Sahlin H, Butz F. One-piece zirconia oral implants: one-year results from a prospective cohort study. 1. Single tooth replacement. *J Clin Periodontol*. 2012; 39(6): 590-7.
37. Chevalier J, Cales B, Drouin JM. Low-temperature aging of Y-TZP ceramics. *J Am Ceram Soc*. 1999; 82: 2150-4.
38. Chevalier J. What future for zirconia as a biomaterial? *Biomaterials*. 2006; 27: 535–43.
39. Deville S, Chevalier J, Fantozzi G, Torrecillas R, Bartolomé JF, Moya JS. Atomic force microscopy study of the surface degradation mechanisms of zirconia based ceramics. *Ceram Eng Sci Proc*. 2004; 25: 289–94.

40. 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: 183-192.
41. Rekow D, Thompson VP. Engineering long term clinical success of advanced ceramic prostheses. *J Mater Sci Mater Med.* 2007; 18(1): 47-56.
42. Sailer I, Zembic A, Jung RE, Siegenthaler D, Holderegger C, Hämmerle CHF. Randomized controlled clinical trial of customized zirconia and titanium implant abutments for canine and posterior single-tooth implant reconstructions: preliminary results at 1 year of function. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20: 219-25.
43. Zembic A, Bösch A, Jung RE, Hämmerle CHF, Sailer I. Five-year results of a randomized controlled clinical trial comparing zirconia and titanium abutments supporting single-implant crowns in canine and posterior regions. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24: 384-90.
44. Kumar Y, Jain V, Chauhan SS, Bharate V, Koli D, Kumar M. Influence of different forms and materials (zirconia or titanium) of abutments in peri-implant soft-tissue healing using matrix metalloproteinase-8: A randomized pilot study. *J Prosthet Dent* 2017; 118: 475-480.
45. Abrahamsson I, Berglundh T, Glantz PO, Lindhe J. The mucosal attachment at different abutments: an experimental study in dogs. [J Clin Periodontol.](#) 1998; 25(9): 721–7.
46. Berglundh T, Lindhe J, Jonsson K, Ericsson I. The topography of the vascular systems in the periodontal and peri-implant tissues in the dog. *J Clin Periodontol.* 1994; 21(3):189-93.
47. James RA, Schultz RL. Hemidesmosomes and the adhesion of junctional epithelial cells to metal implants—a preliminary report. *Oral Implantol.* 1974; 4(3): 294–302.
48. Gould TR, Westbury L, Brunette DM. Ultrastructural study of the attachment of human gingiva to titanium in vivo. *J Prosthet Dent.* 1984; 52(3): 418–20.
49. McKinney RVJr, Steflik DE, Koth DL. Evidence for a junctional epithelial attachment to ceramic dental implants. A transmission electron microscopic study. *J Periodontol.* 1985; 56(10): 579–91.
50. 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: 465–73.
51. Swope EM, James RA. A longitudinal study on hemidesmosome formation at the dental implant-tissue overflow. *J Oral Implantol.* 1981; 9: 412–22.

52. Teng F, Ko C, Kuo H, Hu J, Lin J, Lou C, et al. A comparison of epithelial cells, fibroblasts, and osteoblasts in dental implant titanium topographies. *Bioinorg Chem Appl.* 2012; 1-9.
53. 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 Impl Res.* 2009; 20: 817–26.
54. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 1998; 17: 63-76.
55. Razatos A, Ong YL, Sharma MM, Georgiou G. Evaluating the interaction of bacteria with biomaterials using atomic force microscopy. *J. Biomater.Sci. Polym.* 1998; 9: 1361-73.
56. Drake DR, Paul J, Keller, J.C. Primary bacterial colonization of implants surfaces. *Inter J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14: 226-232.
57. Mabboux F, Ponsonnet L, Morrier JJ, Jaffrezic N, Barsotti O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials--an in vitro study. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2004; 39(4): 199-205.
58. Taira M, Kagiya T, Harada H, Sasaki M, Kimura S, Narushima T, et al. Microscopic observations and inflammatory cytokine productions of human macrophage phagocytising submicron titanium particles. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21: 267-75.
59. 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: 571-7.
60. Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater.* 2008; 24: 299–307.
61. Lucas TJ, Lawson NC, Janowski GM, Burgess JO. Phase transformation of dental zirconia following artificial aging. *Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 00B. 2014; 1-5.
62. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials.* 1999; 20(1): 1-25.
63. Kim JW, Covell NS, Guess PC, Rekow ED, Zhang Y. Concerns of hydrothermal degradation in CAD/CAM zirconia. *J Dent Res.* 2010; 89(1): 91-5.
64. Kim HT, Han JS, Yang JH, Lee JB, Kim SH. The effect of low temperature aging on the mechanical property & phase stability of Y-TZP ceramics. *J Adv Prosthodont.* 2009; 1(3): 113-7.
65. Kobayashi K, Kuwajima H, Masaki, T. Phase change and mechanical properties of $\text{ZrO}_2\text{--Y}_2\text{O}_3$ solid electrolyte after ageing. *Solid State Ion.* 1981; 3(4): 489–95.

66. Rodriguez-Boulan E, Macara IG. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(4): 225-42.
67. Deville S, Chevalier J, Gremillard L. Influence of surface finish and residual stresses on the ageing sensitivity of biomedical grade zirconia. *Biomaterials.* 2006; 27(10): 2186-92.
68. Chevalier J, Loh J, Gremillard L, Meille S, Adolfson E. Low-temperature degradation in zirconia with a porous surface. *Acta Biomater.* 2011; 7: 2986-93.
69. Sanon C, Chevalier J, Douillard T, Cattani-Lorente M, Scherrer SS, Gremillard L. A new testing protocol for zirconia dental implants. *Dent Mater.* 2015; 31(1): 15-25.
70. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation an in vivo study in man. *J Clin Periodontol.* 1990; 17: 138–44.
71. Kloss FR, Steinmüller-Neth 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 Impl Res.* 2011; 22: 699–705.
72. Hormia M, Kononen M, Kivilathi 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: 491–7.
73. Di Carmine M, Toto P, Feliciani C, Scarano A, Tulli A, Strocchi R, Piattelli A. Spreading of epithelial cells on machined and sandblasted titanium surfaces: an in vitro study. *J Periodontol.* 2003; 74: 289–95.
74. Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials.* 1997; 18: 1573-83.
75. Roach P, Farrar D, Perry CC. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *J Am Chem Soc.* 2005; 127: 8168-73.
76. Rigolin MSM, de Avila ED, Basso FG, Hebling J, de S Costa CA, Mollo Junior FA. Effect of different implant abutment surfaces on OBA-09 epithelial cell adhesion. *Microsc Res Tech.* 2017;80(12): 1304-1309.
77. 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; 7(8):37-57.
78. Popovici J, White CP, Hoellec J, Kinklea BK, Lytle DA. Characterization of the cell surface properties of drinking water pathogens by microbial adhesion to hydrocarbon and electrophoretic mobility measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2014; 118:126–32.
79. Colvin RB. Fibrinogen–fibrin interactions with fibroblasts and macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408: 621–33.

80. Tzoneva R, Fauchaux N, Groth T. Wettability of substrata controls cell-substrate and cell-cell adhesions. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1770(11): 1538-47.
81. Gittens RA, Mclachlan T, Olivares-Navarrete R. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*. 2011; 32: 3395-403.
82. Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Fackler A, Follo M, Hellwig E, Bächle M, Hannig C, Han JS, Wolkewitz M, Kohal R. In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(9): 1139-47.
83. Chevalier J, Gremillard L, Deville S. Low-Temperature Degradation of Zirconia and Implications for Biomedical Implants. *Annu Rev Mater Res*. 2007; 37(1): 1–32.
84. Basílio AM, Cardoso VK, Antonio GS, Rizkalla SA, Santos JCG, Arioli FNJ. Effects of artificial aging conditions on yttria-stabilized zirconia implant abutments. *J Prosthet Dent*. 2016; 1-9.
85. Flinn BD, deGroot DA, Mancl LA, Raigrodski AJ. Accelerated aging characteristics of three yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystalline dental materials. *J Prosthet Dent* 2012; 108:223-30.
86. 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.
87. Lee JK, Kim H. Surface crack initiation in 2Y-TZP ceramics by low temperature aging. *Ceram Int*. 1994; 20: 413–8.
88. Lance MJ, Vogel EM, Reith LA, Cannon RW. Low-temperature aging of zirconia ferrules for optical connectors. *J Am Ceram Soc*. 2001; 84: 2731–3.
89. Li J-F, Watanabe R, Zhang B-P, Asami K, Hashimoto K. X-ray Photoelectron Spectroscopy Investigation on the Low-Temperature Degradation of 2 mol% Y₂O₃-ZrO₂ Ceramics. *J Am Ceram Soc*. 1996; 79(12): 3109–12.
90. 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.
91. International Organization for Standardization. ISO 14801:2007. Dentistry -- Implants -- Dynamic fatigue test for endosseous dental implants.
92. Lee TH, Lee SH, Her SB, Chang WG, Lim BS. Effects of surface treatments on the susceptibilities of low temperature degradation by autoclaving in zirconia. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012; 100(5): 1334-43.
93. International Organization for Standardization. ISO 11137:2006. Sterilization of health care products — Radiation — Part 2: Requirements for development, validation, and routine control of a sterilization process for medical devices.

94. Park JH, Olivares-Navarrete R, Baier RE, Meyer AE, Tannenbaum R, Boyan BD, Schwartz Z. Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. *Acta Biomaterialia*. 2012; 8(5): 1966–75.
95. Takamori ER, Cruz R, Fábio Gonçalves F, Zanetti RV, Artemio Zanetti A, Granjeiro JM. Effect of roughness of zirconia and titanium on fibroblast adhesion. *Artificial Organs*. 2008; 32: 305–9.
96. Cotes C, Arata A, Melo RM, Bottino MA, Machado JB, Souza ROA. Effects of aging procedures on the topographic surface, structural stability, and mechanical strength of a ZrO₂-based dental ceramic. *Dental Materials*. 2014; 30: 396–404.
97. 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: 1433–8.
98. 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: 146 – 53.
99. Castilho RM, Squarize CH, Leelahavanichkul K, Zheng Y, Bugge T, Gutkind JS. Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. *PLoS One*. 2010 ;5(5): e10503.
100. Groeger SE, Meyle J. Epithelial barrier and oral bacterial infection *Periodontology 2000*. 2015; 69:46–67.
101. Groessner-Schreiber B, Neubert A, Muller WD, Hopp M, Griepentrog M, Lange KP. Fibroblast growth on surface-modified dental implants: an in vitro study. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 64(4): 591–9.
102. Räisänen L, Kononen M, Juhanoja J, Varpavaara P, Hautaniemi J, Kivilahti J, et al. Expression of cell adhesion complexes in epithelial cells seeded on biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2000; 49: 79–87.
103. Forster A, Ungvári K, Györgyey A, Kukovecz A, Turz K, Nagy K. Human epithelial tissue culture study on restorative materials. *Journal of dentistry*. 2014; 42:7–14.
104. Nagayama M, Sato M, Yamaguchi R, Tokuda C, Takeuchi H. Evaluation of co-aggregation among *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Lett Appl Microbio*. 2001; 33: 122-5.
105. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res*. 2011; 46(2): 252-60.
106. Sánchez MC, Fernández E, Llama-Palacios A, Figuero E, Herrera D, Sanz M. Response to antiseptic agents of periodontal pathogens in in vitro biofilms on titanium and zirconium surfaces. *Dent Mater*. 2017; 33(4): 446-453.

107. Smith NA, Turkyilmaz I. Evaluation of the sealing capability of implants to titanium and zirconia abutments against *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Fusobacterium nucleatum* under different screw torque values. *J Prosthet Dent*. 2014; 112: 561-567.
108. Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001; 17: 793-8.
109. Lee B-C, Jung G-Y, Kim D-J, Han J-S. Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro. *J Adv Prosthodont*. 2011; 3(2):81.
110. Souza RQ, Graziano KU. Compatibilidades e incompatibilidades entre radiação gama e óxido de etileno como métodos sucessivos de esterilização *Rev Esc Enferm USP*. 2010; 44(4): 1124-8.
111. Textor M, Sittig G, Frauchiger V, Tosatti S, et al. Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys. In *titanium in Medicine*. Springer Edited. Berlin-Heidelberg: 2001; 172-224.
112. Kimura Y, Matsuzaka K, Yoshinari M, Inoue T. Initial attachment of human oral keratinocytes cultured on zirconia or titanium. *Dent Mater J*. 2012; 31(3): 346-53.
113. Muñoz EM, Longhini D, Antonio SG, Adabo GL. The effects of mechanical and hydrothermal aging on microstructure and biaxial flexural strength of an anterior and a posterior monolithic zirconia. *J Dent*. 2017; 63: 94-102
114. Flinn BD, Raigrodski AJ, Singh A, Mancl LA. Effect of hydrothermal degradation on three types of zirconias for dental application. *J Prosthet Dent* 2014; 112: 1377-1384.
115. Van Oss CJ, Giese RF. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. *Clays Clay Miner*. 1995; 43(4): 474-7.
116. Ziats NP, Pankowsky DA, Tieney BP, Rathoff OD, Anderson JM. Adsorption of Hagemann factor (factor XII) and other human plasma proteins to biomedical polymers. *Lab Clin Med*. 1990; 116(5): 687-96.
117. Iuliano DK, Saavedra SS, Truskey GA (1993). Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *J Biomed Mater Res*. 1993; 27(8): 1103-13.
118. Oliveira GR, Pozzer L, Cavalieri-Pereira L, de Moraes PH, Olate S, de Albergaria Barbosa JR. Bacterial adhesion and colonization differences between zirconia and titanium implant abutments: an in vivo human study. *J Periodontal Implant Sci*. 2012; 42: 217-23.
119. Barwacz CA, Brogden KA, Stanford CM, Dawson DV, Recker EN, Blanchette D. Comparison of pro-inflammatory cytokines and bone metabolism mediators around titanium and zirconia dental implant abutments following a minimum of 6 months of clinical function. *Clin Oral Implants Res*. 2015; 26: 35-41.

120. Nascimento C, Pita MS, Santos E de S, Monesi N, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, et al. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. *Dent Mater.* 2016; 32: 93-101.
121. Nascimento CD, Pita MS, Fernandes FHNC, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25: 337-43.
122. 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: 73-80.