



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



**MARIA SÍLVIA MAURÍCIO RIGOLIN**

**Influência de características físicas e químicas dos materiais  
de abutments de implantes em zircônia e titânio na adesão e  
viabilidade de células epiteliais gengivais OBA-9**

**Araraquara**

**2014**



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



**MARIA SÍLVIA MAURÍCIO RIGOLIN**

**Influência de características físicas e químicas dos materiais  
de abutments de implantes em zircônia e titânio na adesão e  
viabilidade de células epiteliais gengivais OBA-9**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior

**Araraquara**

**2014**

**MARIA SÍLVIA MAURÍCIO RIGOLIN**

**INFLUÊNCIA DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DE  
DOS MATERIAIS DE ABUTMENTS DE IMPLANTES EM ZIRCÔNIA E  
TITÂNIO NA ADESÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS EPITELIAIS  
GENGIVAIS OBA-9**

**COMISSÃO JULGADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

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

2° examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

3° examinador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

**Araraquara, 11 de março de 2014**

## **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

## DEDICATÓRIA

**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 provações vencidas.

**À minha avó Leonor (*in memoriam*)**, exemplo de mãe, de avó, de pessoa, que me ensinou tudo e que fez com que eu pudesse crescer e chegar até aqui, sinto muito sua falta. Uma das melhores pessoas que já conheci.

**Aos meus pais Celso e Sônia e irmã Nathalia**, pelo apoio, e por terem me dado à possibilidade de adquirir uma boa educação e conhecimento, pelos estudos que me proporcionaram. Só pude conseguir chegar até aqui devido a isso.

**Ao meu namorado, Luis Felipe Zanin** pelo amor e companheirismo.

## 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. Admiro-o demais. Serei eternamente grata ao senhor.

Ao meu grande amor Luis Felipe Zanin pelo incentivo, amor e carinho incondicional em todos os momentos.

Ao meu Tio João, Tia Martha, a filha deles Luciana, aos filhos desta (“Meus sobrinhos”) Nicolas e Giovana, um amor incondicional de família, Meu exemplo. Obrigada por sempre estarem comigo, mesmo fisicamente longe.

Aos meus sogros, Aparecida Catia Braga Zanin e Armando José Zanin, e ao meu cunhado, José Artur (“Pinho”). Vocês sempre me dedicaram um amor fraternal.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, professor do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, obrigada por aceitar ser co-orientador nesta pesquisa, e por permitir que eu a executasse no laboratório pelo qual é professor responsável, e por toda a ajuda, suporte e conhecimento. Muito Obrigada.

À Profa. Dra. Josimeri Hebling, professora do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP pela co-orientação valiosa para este trabalho, que de forma brilhante contribuiu para que esse projeto fosse executado. Muito Obrigada.

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.

À minha companheira Érica Dorigatti de Avila. Não tenho como retribuir tudo o que você fez por mim, desde minha iniciação científica e neste trabalho, com suporte, ajuda no que precisei, estando sempre ao meu lado desde a idéia, planejamento, dúvidas. Além de sua valiosa amizade (“Guru da Sorte”). Aprendi muito com você. Que Deus lhe abençoe muito. E saiba que 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.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, na pessoa da Diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon e da Vice-diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, 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. Francisco de Assis Mollo Junior, e Vice-Chefe Profa. Dra. Ligia Antunes Pereira Pinelli, pela possibilidade de realizar este trabalho.

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 de mestrado concedida, até agosto de 2013, que foi muito importante financeiramente.

À Fundação de Apoio a Pesquisa (FAPESP) - pela bolsa de estudos de mestrado concedida (Processo número: 2013/04825-4) após setembro/2013 até o final do Mestrado, por ser uma grande alegria e muito importante para que pudesse me dedicar a este projeto.

Ao Programa de Apoio à Pós Graduação – UNESP (Proap) pela ajuda em alguns custos da pesquisa.

À Conexão Sistemas de Próteses Ltda., SP, Brasil, pela doação dos discos de titânio e zircônia.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) pela esterilização dos discos.

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.

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 pelo exemplo em dedicação a tudo e a FOAr, 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.

Ao Prof. Dr. Shinya Murakami da (Universidade de Osaka, Japão) que doou à Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer (Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo - USP), que cedeu à Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio pela doação das células OBA-9, colaborando desta forma com o desenvolvimento deste projeto.

À Profa Dra Elaine Maria Sgavioli Massucato que durante 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.

Aos professores da Clínica Integrada, Maurício Meirelles Nagle, Ana Cláudia Gabrielli Piveta, Weber Adad Ricci, Oscar Fernando Muñoz Chávez, Luiz Antônio Borelli Barros, Andréia Affonso Barretto Montandon, onde fiz estágio docência e por me receberem

e me ensinarem muito mais que odontologia. Também agradeço aos funcionários Elisete Ester Venâncio, Glaucia Cristina Figueira Merlos, Isabel Cristina da Silva Morelli, Alessandro Carezia, Maria Isabel da Costa Domiciano, Neli Sandra Aparecida de Oliveira Parreira, pelo excelente convívio.

À todos aqueles da minha família que acompanharam de pertinho todos esses anos.

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.

À Sabrina Maria Castanharo, amizade, conversas, desabafos, apesar de tudo que falamos ser sempre distorcido pela sua ansiedade (Não fique brava).

À Bruna Fernandes Moreira Alfenas pela amizade de sempre e pelo exemplo de esforço, e pela humildade e modéstia (Brincadeira).

À Ana Lúcia Roselino Ribeiro pela amizade conquistada, pelo convívio, pela ajuda e pela troca de experiências, mas principalmente pelas conversas intermináveis. Sempre me identifiquei muito com você e com seu jeito sincero de ser.

À Beatriz Panariello e à Camila Cruz Lorenzetti, pelas conversas no grupo do whatsapp, que além da amizade, me fizeram dar boas risadas.

Às amigas Profa. Dra. Andréa Gonçalves e Edneide Alves Ferreira, que sempre estiveram comigo.

À Sílvia Helena Bernardi Mollo e sua família (Beatriz, Luisa) que sempre me receberam com carinho, alegria e amor em sua casa.

À Carolina Mollo Binda pela amizade, companheirismo, e pelas conversas animadas.

À Leticia Kitagawa, aluna de iniciação científica, por ter contribuído muito na minha caminhada para ser professora, além do excelente convívio que tivemos.

A todos os meus colegas de Mestrado e alunos da pós-graduação por todos os momentos divididos durante esses anos: Gabriela Giro, Gabriela Polli, Gabriel Hatanaka, Samira Branco Martins, Rafael F. S. B. Araújo, Kátia Vieira Cardoso, Miriane Lucindo Zucoloto, Fernanda Salloume Sampaio Bonafé, Livia Amato Bueno Conceição da Silva, Paula Cristina Jordani, Norberto Martins de Oliveira Junior, Diogo Longhini, Fer Alves, Amanda Fucci Wady, Eduardo Buozi Moffa, Fernanda Izumida, Danny Omar Mendonza Marin, Larissa Santana Rodriguez Tampellini, Ana Lucia Franco, Antonio Alves de Almeida Junior, Carina Toda Inoue, Chaiene Evelin Zago, Cristiane Campos Costa Quishida, Eduardo Mariscal Muñoz, Flavia Regina Machado de Medeiros, Giovana Fernandes, Gustavo Henrique Diniz Pimentel, Juliana Cabrini Carmello, Camila Cristina de Foggi, Kassia de Carvalho Dias, Mariana de Almeida Basilio, Rodrigo de Paula Pereira, Cibele Oliveira de Melo Rocha, Claudia Viviane Guimarães Pellissari, Elen Massaro Nunes, Aion Mangino Messias.

Aos meus companheiros e amigos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara Fer Basso, Cláudia Huck, Carol Chaves, Ana Paula Turrioni (Pops), Fernanda Vargas, Pedro Chaves, Prof. Dr. Cleverton Roberto, Elaine Pontes, Juliana Pirola e Débora, Cláudia, Luciana Bianchi, pelos momentos que vivemos no laboratório e o prazer de aprendermos juntos. Em especial a Diana Gabriela de Sousa (Didi), por me ajudar muitas vezes e pela amizade, gosto muito de você. E a Taisa Pansani (Tatá), você é muito especial.

A Érica, Paula, Raissa, e Prof. Vehid Salih pelo agradável convívio e por longas conversas. Ao Cadu, em especial, por várias ajudas com os equipamentos do laboratório. Ao Raphael Ferreira de Souza Bezerra Araujo (Rapha), pelo bom convívio e ajuda sempre.

A Telma Blanca Lombardo Bedran pela ajuda quando eu tinha alguma dúvida com as células OBA-9.

A Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer (Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo - USP), por me receber em seu laboratório no início desta pesquisa. Ao Lucas Almeida do ICB-II, por me deixar acompanhá-lo, durante seus experimentos com as células OBA-9 e me ensinar sobre elas. A todos do laboratório por terem me recebido tão gentilmente.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese Martinha, Miriam, Malú, Adelaide, Sílvia, Adelaide, Dulce, Júnior, Fernando e Lucas pela prestatividade e alegria com que sempre me trataram. Com certeza a execução desse estudo se tornou mais agradável com vocês por perto!

Aos funcionários da seção de Pós-graduação, Mara, Alexandre e Cristiano pela gentileza e preocupação em ajudar a resolver qualquer problema.

A todos os funcionários da biblioteca pela atenção.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Obrigada pelo apoio, carinho e dedicação.

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

## FILOSOFIA DO SUCESSO

Se você pensa que é um derrotado,  
você será derrotado.  
Se não pensar "quero a qualquer custo!"  
Não conseguirá nada.  
Mesmo que você queira vencer,  
mas pensa que não vai conseguir,  
a vitória não sorrirá para você.

Se você fizer as coisas pela metade,  
você será fracassado.  
Nós descobrimos neste mundo  
que o sucesso começa pela intenção da gente  
e tudo se determina pelo nosso espírito.

Se você pensa que é um malogrado,  
você se torna como tal.  
Se almeja atingir uma posição mais elevada,  
deve, antes de obter a vitória,  
dotar-se da convicção de que  
conseguirá infalivelmente.

A luta pela vida nem sempre é vantajosa  
aos fortes nem aos espertos.  
Mais cedo ou mais tarde, quem cativa a vitória  
é aquele que crê plenamente  
**EU CONSEGUIREI!**

Napoleon Hill

Rigolin MSM. Influência de características físicas e químicas dos materiais de abutments de implantes em zircônia e titânio na adesão e viabilidade de células epiteliais gengivais OBA-9 [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

## **Resumo**

Dada à necessidade de uma efetiva barreira tecidual precoce ao redor dos implantes osseointegrados, o presente estudo avaliou, *in vitro*, a influência das características físicas e químicas de materiais simulando superfícies de abutments de implantes em titânio (T) e zircônia ( $ZrO_2$ ) na adesão de células epiteliais gengivais OBA-9. Para este estudo foram utilizados espécimes em forma de discos ( $n=13$ ) de titânio e zircônia, e como controles positivo e negativo, discos de esmalte bovino (EB) e lamínulas de vidro (LV), respectivamente. Foram avaliadas previamente a adesão celular a rugosidade superficial (Ra), energia livre de superfície (ELS) e os elementos químicos presentes na superfície identificados por meio de Espectrômetro de raios-X por Dispersão de Energia em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Após a adesão celular em 1 e 24 horas, foram avaliadas a viabilidade celular por meio do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide); e a morfologia das células aderidas sobre as superfícies por meio de MEV. Os dados de viabilidade celular foram avaliados estatisticamente pelo teste de ANOVA a dois critérios fixos ("material" e "período de análise"), enquanto os dados de ELS foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando um nível de significância de 5%. A superfície de T obteve o maior valor de ELS com 6,2N/m, seguida pela  $ZrO_2$  com 5,8N/m, LV com 4,9N/m, e com o menor valor o EB com 4,7N/m. Foi observado que os fatores material ( $p=0,336$ ) e período de análise ( $p=0,400$ ) não apresentaram efeito sobre os dados de viabilidade celular, assim como a interação entre eles (material\*período de análise,  $p=0,559$ ). A análise da morfologia celular mostrou que as células aderidas às superfícies de T e  $ZrO_2$  apresentaram espriamento semelhante, sendo este maior quando comparado as superfícies de EB e LV. Concluiu-se que não houve diferença entre a adesão celular para os diferentes materiais de abutments de implantes, T e  $ZrO_2$ , nos períodos avaliados. Contudo, o espriamento celular foi qualitativamente maior nas superfícies mais rugosas e com maior ELS de titânio e zircônia.

**Palavras-chaves:** Adesão celular; Células epiteliais; Titânio; Zircônio.

Rigolin MSM. Influence of the physical and chemical characteristics of two surfaces implant abutments, zirconia and titanium, in adhesion and viability of gingival epithelial cells OBA-9 [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

## **Abstract**

Given the need for effective early mucosal barrier around dental implants, the present study evaluated, in vitro, the influence of physical and chemical characteristics of materials simulating abutments implants surfaces in titanium (T) and zirconium (ZrO<sub>2</sub>) on gingival epithelial cells OBA-9 adhesion. For this study, disks-shaped samples (n=13) of titanium and zirconium were tested, and as positive and negative control groups, bovine enamel disks (BE), and glass coverslips (GCS), respectively. Previously the cellular adhesion surface roughness (Ra), surface free energy (SFE) and the chemical composition of specimens by X-ray Spectrometer Dispersive Energy in Scanning Electron Microscope (SEM) were evaluated. After the periods of cellular adhesion, 1 and 24 hours, the cellular viability was evaluated by MTT Assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) and the morphology of the epithelial cells adhered to the surfaces was analyzed using the SEM. The data of cell viability were statistically evaluated by two-way ANOVA ("Material" and "period of analysis"), while the SFE data were submitted to Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests, considering a significance level of 5%. The T specimens showed the highest values of SFE (6.2 N/m), followed by ZrO<sub>2</sub> (5.8 N/m), GCS (4.9 N/m), and BE (4.7 N/m). It was observed that the factors material (p = 0.336) and periods of analysis (p = 0.400) showed no effect on cell viability data, as well as the interaction between them (material\* period of analysis, p = 0.559). The analysis of cell morphology showed that cells adhered to the T and ZrO<sub>2</sub> surfaces presented similar spreading, which was higher compared to the BE and GCS surfaces. It was concluded that there was no difference between the cellular adhesion to different materials for implant abutments, T and ZrO<sub>2</sub>, in evaluated periods. However, cell spreading was qualitatively higher in rougher surfaces and greater titanium and zirconia SFE.

**Key-words:** Cell adhesion; Epithelial Cells; Titanium; Zirconium.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	16
REVISÃO DE LITERATURA .....	20
PROPOSIÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODO.....	30
RESULTADO.....	48
DISCUSSÃO.....	60
CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	68



---

# *Introdução*

## INTRODUÇÃO

O contato direto entre o implante e o osso subjacente, assim como a ausência de processo inflamatório, são necessários para a longevidade dos implantes dentais (Baharloo et al.<sup>6</sup>, 2005). Contudo, mesmo com uma osseointegração satisfatória, o sucesso clínico final dos implantes depende da integridade da área peri-implantar (Jansen et al.<sup>35</sup>, 1999; Holst et al.<sup>31</sup>, 2005). De acordo com a literatura científica, a inflamação dos tecidos peri-implantares é, atualmente, considerada um dos principais responsáveis pela perda dos implantes (Scarano et al.<sup>64</sup>, 2004; Elter et al.<sup>24</sup>, 2008, Bürgers et al.<sup>12</sup>, 2009).

A cavidade oral é constituída por uma grande variedade de microrganismos capazes de desenvolver doenças, como a periodontite e, na presença de implantes, a peri-implantite (Dorkhan et al.<sup>22</sup>, 2012). Após a perda dos dentes causada pela doença periondontal, os microrganismos permanecem sobre as estruturas remanescentes e influenciam diretamente a colonização dos implantes, instalados a posteriori, mesmo após a osseointegração ter ocorrido com sucesso (Botero et al.<sup>10</sup>, 2005; Salvi et al.<sup>61</sup>, 2008, Bürgers et al.<sup>12</sup>, 2009).

Neste sentido, dois componentes do tecido peri-implantar atuam diretamente no sucesso do tratamento com implantes dentários: tecido conjuntivo e epitélio, e cada um desempenha uma determinada função. Uma função inadequada do epitélio peri-implantar poderia levar à criação de bolsas profundas e invasão bacteriana, inflamação e destruição de tecido conjuntivo e subsequente perda óssea (Dale<sup>17</sup>, 2002; Teng et al.<sup>73</sup>, 2012).

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 precoce efetiva capaz de proteger biologicamente as estruturas peri-implantares (Glauser et al.<sup>25</sup>, 2005; Rompen et al.<sup>60</sup>, 2006). Abrahamsson et al.<sup>1</sup>, 1998, examinaram histologicamente a interface de tecido mole em dentes hígidos de animais e observaram que esta interface apresenta uma dimensão variando entre 3-4 mm na direção apico-coronal definida como “espaço biológico”. O tecido presente nesta interface é constituído por duas

zonas: uma epitelial, que recobre aproximadamente 2 mm da superfície, e outra que situa-se logo abaixo, o tecido conjuntivo. Ambos os tecidos contribuem tanto para o estabelecimento do espaço biológico, quanto para impedir a penetração das bactérias orais e os produtos na região periodontal (Abrahamsson et al. 1998<sup>1,2</sup>; Moon et al.<sup>51</sup>, 1999; Damek-Poprawa et al.<sup>18</sup>, 2013).

Da mesma forma, o tecido peri-implantar age esteticamente circundando o abutment e impedindo a penetração de microrganismos e toxinas (Berglundh et al.<sup>8</sup>, 1994; Glauser et al.<sup>25</sup>, 2005). Uma vez que as células epiteliais atingiram a superfície do abutment de implante, a fixação ocorre diretamente por meio de uma lâmina basal (inferior a 200 nm) e pela formação de hemidesmosmosos (James, Schultz<sup>34</sup>, 1974; Gould et al.<sup>27</sup>, 1984; McKinney et al.<sup>48</sup>, 1985; Steflik et al.<sup>69</sup>, 1993; Kawahara et al.<sup>38,39</sup>, 1998; Dale<sup>17</sup>, 2002; Damek-Poprawa et al.<sup>18</sup>, 2013). A literatura mostra que os hemidesmosmosos podem ser formados já entre 2 a 3 dias de cicatrização (Swope, James<sup>71</sup>, 1981).

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 (Stern<sup>70</sup>, 1981; Damek-Poprawa et al.<sup>18</sup>, 2013). 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 (Berglundh et al.<sup>7</sup>, 1991; Buser et al.<sup>13</sup>, 1992; Listgarten et al.<sup>46</sup>, 1992). Como consequência, há uma fraca resistência mecânica de adesão do tecido conjuntivo ao implante quando comparada com a dos dentes naturais (Hermann et al.<sup>29</sup>, 2001).

Como a interface do tecido conjuntivo é considerada de suma importância para apoiar o epitélio e bloquear a migração apical, esta falta de resistência mecânica pode, potencialmente, comprometer o prognóstico de implantes orais. Dilaceração da interface tecido conjuntivo/implante poderia ocorrer devido à falta de estabilidade do tecido mole, o que poderia induzir a migração apical do epitélio juncional, acompanhada por recessões, formação de bolsa, e por reabsorção óssea (Rompen et al.<sup>60</sup>, 2006). Sendo assim, a ausência das fibras de ligação deve

ser compensada pela adesão das células epiteliais às superfícies dos componentes protéticos, ou seja, as características inerentes aos materiais tornam-se, juntamente com as características celulares do epitélio, responsáveis pela estabilidade do tecido mole (Rompen et al.<sup>60</sup>, 2006).

Os materiais utilizados para a confecção de abutments são o titânio (T) e atualmente a zircônia (ZrO<sub>2</sub>). O primeiro ainda é considerado padrão-ouro, já a zircônia, aparece para substituir o titânio em área estética e na presença de gengiva fina e pouco queratinizada (Yildirim et al.<sup>78</sup>, 2000; Glauser et al.<sup>26</sup>, 2004; Molin et al.<sup>50</sup>, 2008; Kohal et al.<sup>41</sup>, 2004; Nakamura et al.<sup>53</sup>, 2010).

Diferentes materiais de superfície do abutment também podem causar vários níveis de tecido periimplantar duro e mole. Conseqüentemente, a composição química e as propriedades físicas da superfície do abutment podem afetar o comportamento de tecidos periimplantares. 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 (Jansen et al.<sup>35</sup>, 1999; Abrahamsson et al.<sup>3</sup>, 2002; Linkevicius, Apse<sup>45</sup>, 2008).

A literatura científica mostra poucos estudos avaliando a qualidade da adesão celular nos componentes protéticos. 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.

Por esta razão, e dada à relevância clínica sobre a adesão celular em superfícies de abutments, o objetivo do estudo foi avaliar a influência do titânio e da zircônia na adesão de células epiteliais gengivais e comparar com o esmalte bovino (EB) e a lamínula de vidro (LV).



---

# *Revisão de Literatura*

## REVISÃO DE LITERATURA

Algumas características dos abutments são de importância crucial para obter uma interface eficaz entre implante e tecido mole (Rompen et al.<sup>60</sup>, 2006). Já é sabido que diferentes materiais de superfície podem causar vários níveis de tecido peri-implantar duro e mole. Conseqüentemente, a composição química e as propriedades físicas (tais como porosidade, rugosidade e morfologia) da superfície dos abutments de implantes podem afetar o comportamento dos tecidos peri-implantares (Marchi et al.<sup>47</sup>, 2010; Teng et al.<sup>73</sup>, 2012).

Em relação à característica química, o titânio é um dos materiais mais comumente utilizados em implantes dentários principalmente pela biocompatibilidade. Em 1995, Andersson et al.<sup>4</sup> afirmaram ser o titânio um excelente material dada a estabilidade e resistência com longevidade. Até a presente data, o titânio é considerado padrão-ouro e tem mantido uma posição dominante como material de abutment e de implante no tratamento em longo prazo. Uma grande desvantagem do abutment de titânio é a cor que pode prejudicar a estética quando em casos de gengiva fina e pouco queratinizada. A demanda por restaurações estéticas favoreceu a introdução de abutments para implantes de cerâmica (Yildirim et al.<sup>78</sup>, 2000; Brodbeck et al.<sup>11</sup>, 2003, Glauser et al.<sup>26</sup>, 2004) produzidos, primeiramente, com alumina sinterizada. Devido à fragilidade das propriedades mecânicas dos abutments de alumina, a zircônia ou dióxido de zircônio, estabilizado com ítrio, foi introduzido como um material alternativo e superou a alumina como o material preferido para abutments cerâmicos (Holst et al.<sup>31</sup>, 2005). As propriedades mecânicas e micro estruturais da zircônia, assim como a biocompatibilidade, têm sido bem documentadas (Denry et al.<sup>19</sup>, 2008; Hisbergues et al.<sup>30</sup>, 2009). Na odontologia, a zircônia tem sido utilizada para aplicações clínicas em coroas de cerâmicas, próteses parciais fixas (PPF) (Molin et al.<sup>50</sup>, 2008), suportes para o tratamento ortodôntico (Springate et al.<sup>67</sup>, 1991), implantes e abutments. A zircônia é um material polimórfico que exhibe quatro diferentes estruturas cristalinas (Wenz et al.<sup>77</sup>, 2008; Kohal et al.<sup>41</sup>, 2004). À temperatura ambiente, a zircônia pura existe em uma forma monoclinica. A adição de óxidos para estabilizar a zircônia gera uma estrutura multifásica, denominada

fase metaestável tetragonal o que confere boas propriedades mecânicas. Apesar de a cerâmica, como material de abutment, já vir sendo utilizada em odontologia há alguns anos, apenas um número limitado de artigos sobre o assunto têm sido publicados até os dias de hoje (Brodbeck et al.<sup>11</sup>, 2003; Kohal et al.<sup>41</sup>, 2004).

Após a instalação do implante, na fase inicial celular, a adesão e a proliferação celular para os substratos podem variar de acordo com a topografia da superfície, o que por sua vez influencia também nos componentes do citoesqueleto celular. Vários experimentos relacionados relataram que as condições da superfície podem afetar a morfologia das células (Bürgers et al.<sup>12</sup>, 2009; Teng et al.<sup>73</sup>, 2012). Além dos fatores inerentes a histopatofisiologia do tecido peri-implantar, existem diferenças nos desenhos e formas dos implantes ou macroestrutura (rosqueáveis ou batidos; um ou dois estágios cirúrgicos), no tipo de superfície ou microestrutura (titânio comercialmente puro, ligas de titânio, titânio plasma spray, hidroxiapatita, superfícies jateadas com óxidos, tratadas com ácidos ou uma associação destas para alterar a superfície do implante) e o grau de lisura ou rugosidade da superfície ou ultraestrutura (cristalinidade da hidroxiapatita que reveste o implante, tipo do ácido ou óxido utilizado), bem como diferentes formas e materiais de abutments (Tesmer et al.<sup>74</sup>, 2009). Assim, estas várias diferenças entre dentes e implantes podem influenciar diretamente a adesão celular local (Rompen et al.<sup>60</sup>, 2006; Damek-Poprawa et al.<sup>18</sup>, 2013). Em 2006, Rompen et al.<sup>60</sup> revisaram a literatura para o efeito das características dos materiais, da topografia de superfície e dos componentes dos implantes e conexões sobre a integração dos tecidos moles, utilizando estudos *in vitro*, em animais e em humanos. Os autores concluíram que a formação inicial de uma longa barreira tecidual efetiva, capaz de proteger biologicamente as estruturas peri-implantares, é de importância primordial e, esta barreira depende das características químicas e físicas dos materiais.

Da mesma forma que a característica química, a estrutura física do material também mostra diferentes resultados (Räisänen et al.<sup>58</sup>, 2000; Säuberlich et al.<sup>63</sup>, 1999; Groessner-Schreiber et al.<sup>28</sup>, 2003). Resultados de estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que a rugosidade e textura de superfície em micrômetros pode ter um impacto sobre os eventos iniciais da cicatrização influenciando a fixação,

orientação, proliferação e metabolismo das células epiteliais e do tecido conjuntivo (Hormia et al.<sup>32</sup>, 1991; Kononen et al.<sup>42</sup>, 1992; Meyle<sup>49</sup>, 1999; Di Carmine et al.<sup>20</sup>, 2003; Di Iorio et al.<sup>21</sup>, 2005). Estes estudos, também, indicaram que a adesão de células epiteliais é menor sobre superfícies rugosas de titânio comparadas às superfícies lisas do titânio polido. Já é sabido que as superfícies rugosas dos implantes de titânio favorecem a adesão de células ósseas, devido à formação de uma rede superficial de fibrina, ao contrário das células epiteliais.

No caso de abutments de implantes, um valor de 0,2  $\mu\text{m}$  tem sido aceito como o limiar de rugosidade média mínima necessária para manter o selamento entre as células epiteliais e a superfície e, conseqüentemente, a estabilidade do tecido mole (Clark et al.<sup>14</sup>, 1987; Bollen et al.<sup>9</sup>, 1996; Mustafa et al.<sup>53</sup>, 2008). De acordo com Quirynen et al.<sup>57</sup>, (1990), superfícies rugosas reforçam a formação de biofilme bacteriano e para superar esse obstáculo e favorecer a adesão das células epiteliais gengivais, a superfície do abutment do implante deve ser polida (Kloss et al.<sup>40</sup>, 2011). Neste contexto, Baharloo et al.<sup>6</sup>, 2005 observaram que as superfícies ásperas diminuíam o crescimento e a propagação das células epiteliais quando comparadas as superfícies polidas em um período de 28 dias. Ao mesmo tempo, estes autores ressaltaram que a adesão dessas células em superfícies polidas é maior que em superfícies rugosas. Como este resultado indica uma forte aderência destas células às superfícies polidas, é provável que em tratando-se de superfícies rugosas estas mesmas células sejam mais susceptíveis a remoção mecânica. Inúmeros estudos foram realizados para demonstrar, a orientação dos fibroblastos e das células epiteliais *in vitro* sobre uma determinada superfície e foi observado que as células se orientam na direção das microranuras da superfície do substrato (Singhvi et al.<sup>65</sup>, 1994; Oakley, Brunette<sup>55</sup>, 1995; Curtis, Wilkinson<sup>16</sup>, 1997). Embora não haja uma explicação direta para este fenômeno de contato guiado, alguns autores supõe que o contato inicial entre as células e o substrato ocorreria com a formação de micro-extensões celulares. Após esta adesão inicial, ocorreria um subsequente aumento da ligação entre elas que resultaria em um espalhamento seguido por migração celular pela superfície do material. Finalmente, a orientação e a forma das células estão diretamente relacionadas à micro-geometria da

superfície desta estrutura. Isto aumentaria a estabilidade e aderência celular (Jansen et al.<sup>35</sup>, 1999). Outra característica interferente na adesão celular é a energia livre de superfície que pode desempenhar um papel importante não só sobre a adsorção de proteínas, mas também em relação à adesão das células e ao posterior espalhamento destas (Jansen et al.<sup>35</sup>, 1999; Rompen et al.<sup>60</sup>, 2006). De acordo com Colvin et al.<sup>15</sup> (1983), as superfícies, quando hidrofóbicas, diminuem a quantidade de proteínas aderidas na superfície do material. As mudanças físicas da superfície alteram a expressão dos sítios ligantes das mesmas, que conseqüentemente, irão interagir com os receptores celulares. Por conseguinte, é possível afirmar que as características físicas, tais como rugosidade e energia livre de superfície, assim com as propriedades químicas das mesmas podem contribuir positivamente para a adesão de células epiteliais e conjuntivas (Sardin et al.<sup>62</sup>, 2004; Teng et al.<sup>73</sup>, 2012).

Abrahamsson et al.<sup>1</sup> (1998), compararam a reação dos tecidos peri-implantares em abutments de titânio, liga de ouro, e de óxido de alumínio e abutments individualizados com porcelana dental em cães. Os autores observaram, que os abutments produzidos tanto com titânio quanto com cerâmica, permitiram a formação de uma porção de tecido epitelial e uma porção conjuntiva de cerca de 2 e 1,5 milímetros, respectivamente. Avaliações histométricas mostraram que a perda óssea foi de 0,78 mm em torno pilares de titânio (controle), 0,80 mm em torno de pilares de óxido de alumínio, 1,80 mm em torno de pilares de liga de ouro, e 1,26 mm em torno de pilares de porcelana dentária. A avaliação clínica mostrou recessão do tecido mole ao redor de pilares de liga de ouro. As diferenças observadas podem ser o resultado de variadas propriedades dos materiais estudados ou das variações na resistência à corrosão. Por conseguinte, os autores concluíram que as características químicas dos diferentes materiais influenciaram o comportamento celular e conseqüentemente a adesão sobre as superfícies. Este resultado foi mais bem interpretado por Räsänen et al.<sup>58</sup>, em 2000. Os autores estudaram, *in vitro*, como ocorre a adesão das células epiteliais sobre cinco diferentes superfícies de materiais dentários (titânio, liga de titânio Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V, liga de ouro, porcelana e óxido de alumínio). A eficácia da adesão foi avaliada por meio de

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Imunofluorescência. As células epiteliais aderiram-se e espalharam-se mais avidamente sobre superfícies metálicas (titânio, liga de titânio Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V, liga de ouro) do que em superfícies de cerâmica (porcelana e óxido de alumínio). Contatos focais bem organizados e pré-hemidesmossomos foram encontrados em superfícies metálicas, mas não em porcelana e óxido de alumínio.

Em 2005, Glauser et al.<sup>25</sup> caracterizaram histologicamente a barreira de tecido mole peri-implantar formada em seres humanos ao redor de mini-implantes experimentais não segmentados com topografias diferentes de superfície (usinado, oxidado ou condicionado). Após a cicatrização transmucosa de 8 semanas, a conexão dos abutments dos implantes e os mini-implantes foram removidos com uma camada de tecido circundante duro e mole. Em seguida, os autores, por meio de observações histométricas, notaram que a altura total da barreira de tecido mole peri-implantar foi cerca de 4 a 4,5 mm e consistia de tecido epitelial e conjuntivo. O epitélio juncional aderiu à superfície do implante, ao passo que as fibras de colágeno e fibroblastos do selamento do tecido conjuntivo foram orientadas paralelamente ao implante. A inserção epitelial foi menor nas superfícies oxidadas (1,6 mm) e condicionadas (1,4 mm) em comparação com as superfícies polidas (2,9 mm). Uma relação inversa ocorreu com a vedação do tecido conjuntivo, os mini-implantes oxidados (2,2 mm) e condicionados (2,6 mm) exibiram uma maior zona de vedação quando comparados ao usinado (0,7 mm). Em conclusão, o tecido mole peri-implantar formado no experimento com mini-implantes não segmentados em seres humanos foi semelhante ao descrito em estudos com animais. Os implantes oxidados e condicionados permitiram menor crescimento epitelial e maior vedação dos implantes usinados com tecido conjuntivo. Apesar do contato do tecido conjuntivo ao redor de implantes ser diferente em relação a dos dentes, as dimensões da barreira de tecido mole se mostraram semelhantes.

Em uma revisão sistemática, Linkevicius, Apse<sup>45</sup> (2008) analisaram as informações disponíveis quanto ao fato de abutments de titânio promoverem uma maior estabilidade para os tecidos peri-implantares, em comparação com abutments de ouro, de zircônia e de alumínio. Neste estudo foram incluídos nove

artigos: 3 estudos com animais, 2 estudos humanos histológicos, e 4 ensaios clínicos. A recessão dos tecidos moles não foi devidamente avaliada nos estudos clínicos. Avaliação dos tecidos peri-implantares ao redor de abutments de zircônia e titânio foi descrita apenas em estudos histológicos animais e humanos. Dada às diferenças nos tipos de estudo: tempo e variáveis de resultados, a metanálise não pôde ser executada. Assim, esse trabalho concluiu que os abutments de titânio não proporcionam um nível mais elevado de osso em comparação com abutments de ouro, alumínio e zircônia. Em estudos histológicos realizados em animais, o titânio e a zircônia mostraram relação semelhante entre os tecidos moles e duros. Já em material histológico de humanos, estes abutments indicaram uma relação melhor da mucosa humana para a zircônia em comparação com o titânio. No entanto, os abutments de zircônia não foram testados em estudos clínicos controlados com abutments de titânio e por este motivo, não houve nenhuma evidência de que os abutments de titânio possuem melhor desempenho na manutenção de tecidos peri-implantares estáveis, em comparação com os demais abutments. Em concordância, Nakamura et al.<sup>53</sup>, em 2010, realizaram uma revisão sistemática e mostraram que a zircônia é o material adequado para confecção de abutment quando comparado ao titânio, uma vez que as dimensões dos tecidos moles peri-implantares ao redor da ZrO<sub>2</sub> mostraram superioridade quando comparadas ao metal.

Em 2012, Teng et al.<sup>73</sup> estudaram a relação de células/implantes para desenvolver uma arquitetura apropriada dos tecidos sobre superfícies de titânio puro. A fase inicial de adesão e capacidade de repovoamento dos osteoblastos (MC3T3-E1), dos fibroblastos (NIH 3T3), e das células epiteliais (XB-2). Os resultados mostraram que as qualidades adesivas das células XB-2 em uma superfície polida foram melhores do que aquelas em superfícies rugosas, as propriedades proliferativas foram invertidas. Os efeitos da rugosidade nas características de células 3T3 foram opostos ao resultado observado para as células XB-2. Capacidades proliferativas de E1 não diferiram com significância estatística. Estes resultados sugeriram que uma superfície mais rugosa possui a capacidade de aumentar a proliferação de osteoblastos e de inibir o crescimento de

fibroblastos que melhoram a taxa de sucesso de implantes. Os autores concluíram, também, que técnicas necessárias para harmonizar a adesão da fase inicial e a proliferação de osteoblastos e células epiteliais no implante são importantes. O implante pode ser concebido com uma superfície usinada na área superior mais próxima da superfície gengival, para promover a rápida adesão celular epitelial com o objetivo de prevenir a inflamação após a implantação (Teng et al.<sup>73</sup>, 2012).

Para melhor elucidar o assunto e fornecer respostas mais precisas às questões levantadas, estudos adicionais *in vitro*, ensaios clínicos controlados randomizados, são necessários. A literatura mostra que experimentos *in vitro* fornecem um modelo adequado ou explicação para os mecanismos de funcionamento do comportamento celular em resposta a materiais de implante (Jansen et al.<sup>35</sup>, 1999). Muitas investigações se concentraram na osseointegração dos implantes dentários (Kawahara et al.<sup>39</sup>, 1998; Wenz et al.<sup>77</sup>, 2008), contudo, poucos estudos tem investigado a relação biológica da aderência dos tecidos moles em relação a diferentes superfícies de abutment do implante (Teng et al.<sup>73</sup>, 2012).



---

*Proposição*

## PROPOSIÇÃO

### *Objetivo Geral*

Dada à necessidade de uma efetiva barreira tecidual ao redor dos implantes osseointegrados, o presente estudo avaliou, in vitro, a influência de características físicas e químicas de materiais abutments de implantes em titânio e zircônia na adesão e viabilidade de células epiteliais gengivais.

### *Objetivos específicos*

- Avaliar em superfícies com rugosidade padronizada a energia livre de superfície e os elementos químicos que as compõe por meio de Espectrômetro de raios-X por Dispersão de Energia (EDS) em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) previamente a adesão celular;
- Avaliar a viabilidade das células epiteliais gengivais OBA-9 por meio do MTT em duas superfícies de abutments de implantes (titânio e zircônia) e em superfície de esmalte bovino e lamínula de vidro;
- Avaliar a morfologia das células epiteliais gengivais OBA-9 aderidas nas superfícies citadas acima por meio de MEV.

Este estudo experimental testará a hipótese nula de que não haverá diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos.



---

# *Material e Método*

## MATERIAL E MÉTODO

- **Primeira Etapa – Preparação das Amostras**

### ***Materiais testados***

Discos de titânio comercialmente puro (Conexão Sistemas de Próteses Ltda., SP, Brasil) e de zircônia (Conexão Sistemas de Próteses Ltda., SP, Brasil) foram confeccionados nas dimensões 8 mm de diâmetro por 2 mm de espessura, aproximadamente 151 mm<sup>2</sup> de área total (Lima et al.<sup>44</sup>, 2008). Estes dois tipos de discos foram cedidos pela empresa Conexão Sistemas de Próteses Ltda., SP, Brasil e vieram em embalagens individuais já esterilizados em radiação gama. Discos de esmalte foram confeccionados a partir de dentes bovinos fornecidos pelo frigorífero Mondelli, nas mesmas dimensões citadas acima, tais espécimes e lamínulas de vidro (Fischer Cientific, Pittsburgh, PA, USA) foram utilizados como controle.

Os grupos experimentais Titânio e Zircônia foram comparados com dois grupos controle, sendo o primeiro representado por discos de esmalte bovino, a fim de simular a adesão celular observada na cervical de um dente hígido, o segundo utilizando uma lamínula de vidro, simulando condições ideais de cultura celular, porém que permitisse a análise por meio de MEV (Di Carmine et al.<sup>20</sup>, 2003; Groessner-Schreiber et al.<sup>28</sup>, 2003; Andrade Junior et al.<sup>5</sup>, 2007; Takamori et al.<sup>72</sup>, 2008).

Os grupos foram divididos de acordo com os métodos de análise e materiais utilizados para a adesão celular (Tabela 1).

**Tabela 1-** Número de amostras de acordo com os grupos experimentais.

	T	T	ZrO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub>	EB	EB	LV	LV
	MTT	MEV	MTT	MEV	MTT	MEV	MTT	MEV
<b>1h</b>	11	2	11	2	11	2	11	2
<b>24h</b>	11	2	11	2	11	2	11	2

T- Titânio; ZrO<sub>2</sub>- Zircônia; EB- Esmalte Bovino (controle positivo); LV- Lamínula de Vidro (controle negativo); MTT- Teste MTT - Análise da Viabilidade Celular MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

### ***Obtenção dos blocos de esmalte***

Foram preparados 50 blocos de esmalte a partir de incisivos bovinos (Figura 1) (Soares et al.<sup>68</sup>, 2013). Os dentes foram submetidos à remoção de restos de ligamento periodontal e armazenados até o momento da utilização em solução de timol 0,1% a 4°C a fim de inibir eventual atividade microbiana.

**Figura 1-** Dente Bovino



Para obtenção dos blocos de esmalte, foi utilizada uma broca diamantada 10 mm para vidro com rosca (Dinser Ferramentas Diamantadas Ltda, São Paulo - Brasil) acoplada ao equipamento furadeira de bancada profissional da marca Schulz com morsa móvel (modelo FSB 16 - cone mandril DIN 238-B18 – capacidade de furação 16 m/m - potência 12 CV (Figura 2).

**Figura 2-** Equipamento furadeira de bancada profissional da marca Schulz



O dente bovino foi posicionado e fixado em um dispositivo. E este fixado no suporte da furadeira de bancada para que pudesse ficar estável durante o corte, além de estar imerso em água destilada gelada (Figura 3a e 3b), para que haja a refrigeração (Soares et al.<sup>68</sup>, 2013).

**Figura 3a-** Dente bovino fixado no dispositivo.



**3b-** Dispositivo fixado no suporte do aparelho para que pudesse ficar estável durante o corte.



Para a regularização das superfícies, os blocos foram desgastados com lixas de carbeto de silício de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil), posicionadas na Politriz (Metaserv 2000). Posteriormente, lixas de carbeto de silício de granulações 1200 e 2500 (T469-SF-Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) foram utilizadas para polir a superfície e reduzir a rugosidade da mesma. O polimento, com a lixa de carbeto de silício de granulação 4000, foi realizado por 30 segundos sob a superfície de cada disco com o objetivo de alcançar a rugosidade entre 0,05  $\mu\text{m}$  e 0,1  $\mu\text{m}$  (Figura 4) (Soares et al.<sup>68</sup>, 2013).

**Figura 4-** Disco de esmalte bovino com 151 mm<sup>2</sup> de área superficial.



### ***Padronização da rugosidade superficial***

A análise da Ra dos discos de T, ZrO<sub>2</sub>, EB e LV foi realizada pelo rugosímetro portátil (Mitutoyo surftest SJ-400, Mitutoyo Corporation, Japão) (Figura 5) com: precisão de leitura de 0,01µm, comprimento de leitura de 2,5 mm, velocidade da ponta ativa de 0,5 mm/s e raio da ponta ativa de 5 µm. Para isto, foram utilizados os parâmetros: Ra (rugosidade média), que corresponde à média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento (picos e vales) em relação à linha média dentro do percurso de medição (Bürgers et al.<sup>12</sup>, 2009, Teng et al.<sup>73</sup>, 2012).

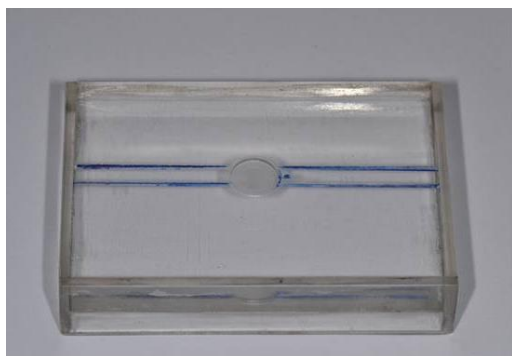
**Figura 5-** Rugosímetro portátil



O processo de fabricação dos discos de T e  $ZrO_2$  garantiu a mesma rugosidade confeccionada para abutments clínicos enviados ao mercado.

Com o objetivo de padronizar as mensurações da rugosidade superficial das amostras, foi desenvolvido um dispositivo em resina acrílica, composto por duas ranhuras paralelas entre si, e uma central definindo o norte dos discos (Figura 6). Este dispositivo foi colocado no suporte do rugosímetro, de tal forma que a ranhura central permanecia sempre no mesmo sentido (Figura 7). Assim a análise da rugosidade foi realizada no centro de todas as amostras.

**Figura 6-** Dispositivo para leitura da rugosidade superficial.



**Figura 7-** Dispositivo sobre o suporte para leitura da rugosidade superficial.

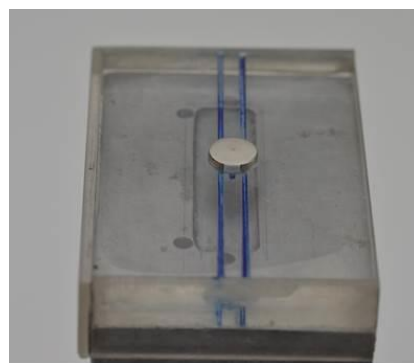


Um adesivo foi posicionado na extremidade de cada disco de T e  $ZrO_2$  para coincidir com a ranhura central do dispositivo e padronizar a forma de leitura (Figuras 8 e 9). Este protocolo permitiu que as leituras fossem realizadas próximas a mesma posição, garantindo a confiabilidade na técnica no momento de selecionar os discos que apresentaram medidas reprodutíveis.

**Figura 8-** Disco de Titânio com fita adesiva na lateral.



**Figura 9-** Disco de Titânio colocado sobre o dispositivo.



Então a ponta do rugosímetro foi posicionada paralelamente a primeira marcação como mostra a Figura 10, e em seguida, na marcação inferior. Este procedimento foi realizado em ambos os lados. O mesmo procedimento se repetiu para os discos de zircônia.

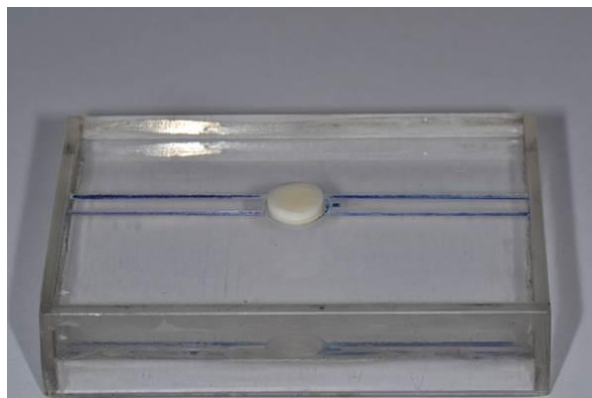
**Figura 10-** Posicionamento da ponta do rugosímetro paralela à marcação em forma de linha superior.



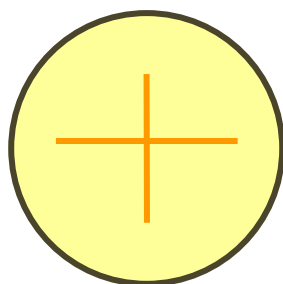
Já em relação ao esmalte bovino, dada à irregularidade da superfície dos discos, estes foram posicionados no orifício do dispositivo (Figura 11) e então, a leitura da rugosidade se deu de forma perpendicular (Figura 12). A primeira leitura feita com a ranhura central do dispositivo para a direita, então mudando o suporte

de posição com a ranhura central voltado para trás, foi realizada a segunda leitura no disco de esmalte, ou seja, uma leitura perpendicular à primeira anteriormente realizada.

**Figura 11-** EB no dispositivo para leitura da rugosidade.



**Figura 12-** Ilustração mostrando as direções das leituras.



A leitura da rugosidade na lamínula de vidro foi realizada da mesma forma que os discos de EB devido ao maior diâmetro (13 mm) destas amostras comparado aos demais materiais. Por este motivo, elas foram posicionadas sobre o centro do dispositivo e as leituras realizadas em direções perpendiculares.

Para verificar o grau de confiabilidade dos resultados, as leituras dos discos de zircônia e titânio foram analisadas em duas ocasiões diferentes, respeitando um intervalo de duas semanas entre a primeira e a segunda leitura. A leitura da rugosidade foi realizada para todos dos materiais citados acima e definiu a seleção dos discos incluídos na pesquisa.

### ***Limpeza dos corpos de prova***

Para remover qualquer material orgânico aderido à superfície, foi realizada a limpeza dos discos de acordo com o seguinte protocolo (Park et al.<sup>56</sup>, 2012):

- 1) Imersão dos corpos de prova imersos por 20 minutos em acetona,
- 2) Imersão dos corpos de prova em tubos de ensaio contendo água destilada em ultrassom por 20 minutos,
- 3) Lavagem abundante com água destilada.

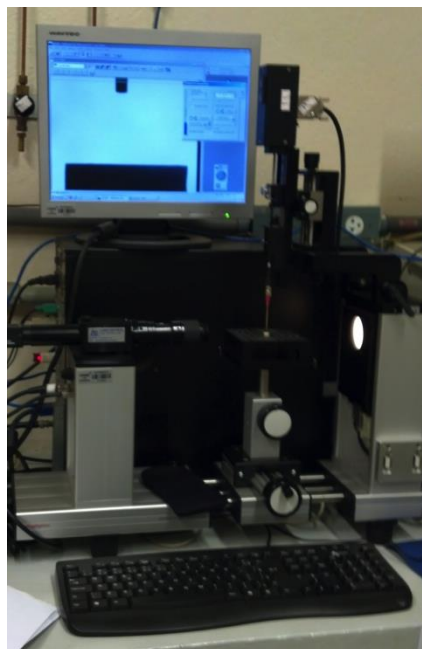
### ***Espectrometria de raios-X por Dispersão de Energia (EDS) em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)***

Uma amostra de cada grupo foi utilizada para caracterizar a superfície por meio do Espectrômetro de raios-X por Dispersão de Energia ou EDS acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (Philips - XL 30 FEG), detectores que captam raios-X característicos utilizados por dispersão de energia, com o objetivo de demonstrar os elementos químicos das amostras antes da adesão. Previamente a esta análise os discos foram armazenados em dissecador.

### ***Medida da energia livre de superfície***

A energia livre de superfície foi realizada no Goniômetro (Goniômetro Optical Contact Angle Measurements SCA20 - DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Baden-Württemberg, Alemanha) (Bürgers et al.<sup>12</sup>, 2009; Teng et al.<sup>73</sup>, 2012) (Figura 13) do Instituto de Química de Araraquara-UNESP.

**Figura 13-** Goniômetro Optical Contact Angle Measurements SCA20



A energia livre de superfície (ELS) é uma medida indireta que utiliza a medição do ângulo de contato de líquidos contendo polaridades diferentes para ser determinada. Menor ângulo de contato significa que o líquido e a superfície apresentam a mesma natureza química, permitindo maior molhamento (Janssen et al.<sup>36</sup>, 2006). Uma vez que o líquido e a superfície apresentam polaridades diferentes, a gota não é capaz de interagir, por meio das forças intermoleculares com o material e, portanto, não ocorre o molhamento (Janssen et al.<sup>36</sup>, 2006). Quando isto ocorre na presença de um líquido polar, é possível definir o tipo de superfície como lipossolúvel, ou hidrofóbica. O Quadro 1 apresenta os agentes molhantes utilizados no estudo em questão, com as respectivas polaridades.

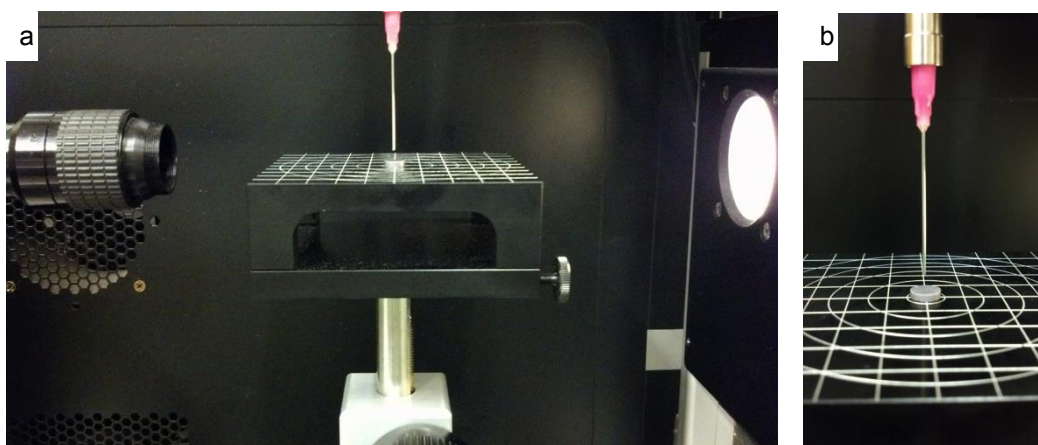
**Quadro 1-** Agentes molhantes e respectivas polaridades utilizadas para a avaliação da energia livre de superfície.

<i>Agente Molhante</i>	<i>Polaridade</i>
Água Destilada	52,5
Etilenoglicol	19,0
Polietilenoglicol	13,6
Diiodometano	2,6

Medidas dos ângulos de contato estáticos com o método da gota séssil foram gravadas e analisadas à temperatura ambiente em um medidor de ângulo de contato OCA-20 DataPhysics Instruments GmbH com software SCA20 (Janssen et al.<sup>36</sup>, 2006).

Cada corpo de prova de cada material foi posicionado em uma mesa entre a câmera e a lente (n=5) (Figuras 14 a, b).

**Figura 14a-** Corpo de prova posicionado no Goniômetro. **14b-** Visão mais aproximada do corpo de prova posicionado no Goniômetro.

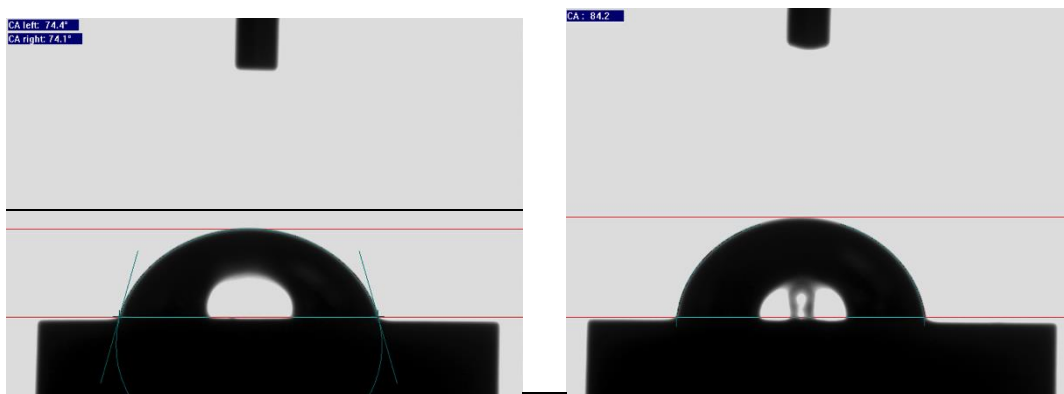


Todas as gotas dispensadas possuíam o mesmo volume (0,248  $\mu$ l), padronizado pelo equipamento. Após a gota atingir a superfície, um intervalo de 10 segundos foi estabelecido como tempo de acomodamento, para estabilização e interação do líquido com a superfície. Foram avaliados os ângulos de contato,

direito e esquerdo, formados entre a superfície de cada material e a gota correspondente a cada líquido, e então o ângulo de contato final (Figuras 15a e b) foi calculado utilizando a equação de Laplace-Young (Janssen et al.<sup>36</sup>, 2006).

**Figura 15a-** Imagem mostrando a gota de água destilada sobre corpo de prova de Titânio e os respectivos valores de ângulos de contato, direito e esquerdo.

**Figura 15b-** Ângulo de contato final calculado por meio da equação de Laplace-Young.



Para este método de análise, foram utilizados 5 discos de cada material e sobre cada disco, referentes a cada material foram realizadas três mensurações, ou seja, o gotejamento do líquido foi repetido sobre a mesma superfície três vezes (Janssen et al.<sup>36</sup>, 2006). Para cada material, foram obtidos quatro valores de ângulos de contato, cada um correspondendo a um líquido diferente. Estes valores foram inseridos em um software para o cálculo da energia livre de superfície utilizando o conceito de componentes polares e dispersão com o método de OWRK (Owens–Wendt–Rabel–Kaelble) (Janssen et al.<sup>36</sup>, 2006).

### ***Esterilização dos corpos de prova***

Após a avaliação da rugosidade superficial e a avaliação da energia livre de superfície, os discos foram distribuídos nos grupos experimentais e controles, a partir destes valores, por aleatorização por restrição. Em seguida, todos os espécimes foram esterilizados por meio de radiação gama (IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, Brasil). As amostras foram

irradiadas com 25 kGy a partir de uma fonte de cobalto 60 artificial, em um reator nuclear (ISO-11137:2006).

Foi realizada a esterilização por radiação gama dos discos, pois primeiro já vieram esterilizados dessa forma, segundo que há relato que se primeiro for esterilizado com raio gama e depois por oxido de etileno é formada alta concentração de um subproduto tóxico do oxido de etileno – a Etileno Cloridrina. Além de possuir menos itens a favor do óxido de etileno, por gerar resíduos e assim há necessidade de um período de espera para que esse resíduo não interfira na execução de estudos, enquanto que a irradiação por raios gama é uma alternativa eficiente para esterilização, não produz resíduos e promove a redução de carga microbiana (Souza, Graziano<sup>66</sup>, 2010).

- **Segunda Etapa – Adesão Celular**

### ***Cultura de Células***

Para a realização deste estudo, foram utilizadas células epiteliais gengivais humanas imortalizadas (OBA-9) advindas do laboratório do Prof. Dr. Shinya Murakami da Universidade de Osaka, Japão, e cedidas à Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio (Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP), pela Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer (Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo - USP) (Kusumoto et al.<sup>43</sup>, 2004; Kajiya et al.<sup>37</sup>, 2011; Umeda et al.<sup>75</sup>, 2012).

### ***Descongelamento das células***

Para a realização dos experimentos, uma alíquota das células OBA-9, armazenada em freezer a -80°C foi transferida para um frasco de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura Keratinocyte serum free medium (KSFM - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, as células foram mantidas em estufa de células a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e, após 30 minutos, o comportamento celular foi observado. Por conseguinte, foi aguardado um período

de 2 dias para o crescimento celular até que se obteve a monocamada, com confluência de 80%, atingindo assim o número de células adequado para a execução do piloto.

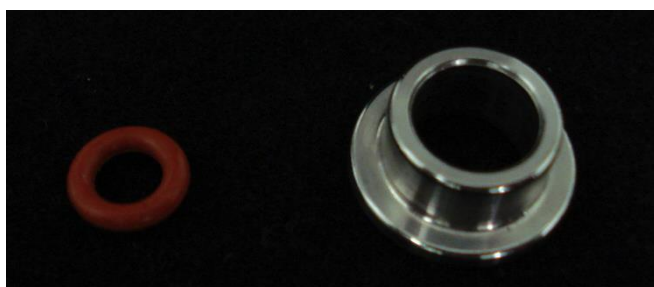
### ***Cultivo das células OBA-9***

As células foram mantidas em meio de cultura KSFM, suplementado com insulina, fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), além de 100 IU/mL de penicilina (Umeda et al.<sup>75</sup>, 2012). Após a suplementação com os fatores de crescimento o meio foi mantido em privação de luz, pois o mesmo apresenta alta fotossensibilidade. Todas as células foram mantidas em incubadora (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar (Umeda et al.<sup>75</sup>, 2012) e foram subcultivadas de acordo com a confluência, até ser obtido o número adequado para a realização da pesquisa. Este subcultivo foi realizado utilizando Tripsina (TrypLE™ Express (1X), no Phenol Red (Gibco®). Para coibir a ação da tripsina foi realizada lavagem cuidadosa com solução Inibidora de Tripsina (Trypsin Inhibitor, soybean/ Gibco®).

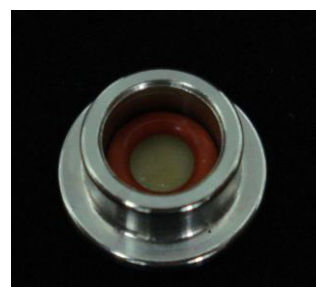
### ***Adesão celular***

A adesão celular foi realizada em 13 corpos de prova (11 para MTT e 2 para MEV) para cada material. Os experimentos foram realizados em três momentos diferentes. Utilizando uma pinça estéril, os espécimes foram colocados individualmente em placas de 24 compartimentos. Sobre os discos foram colocados anéis (silicone e metálico), para padronizar a área de adesão celular (Figuras 16a e 16b). Após tripsinização e determinação da densidade celular, foram cultivadas  $5 \times 10^4$  células/well sobre cada corpo de prova (Figura 17).

**Figura 16a-** Anéis de metal e silicone utilizados para adaptação dos corpos de prova.



**16b-** Ilustração do conjunto anéis/corpo de prova



**Figura 17-** Conjunto anéis/corpo de prova em um compartimento.



Os discos permaneceram na placa em contato com as células epiteliais pelos períodos de um 1 hora e 24 horas (Teng et al.<sup>73</sup>, 2012). Em seguida, a suspensão celular foi aspirada e a viabilidade e morfologia celular foram determinadas através do teste de MTT e por microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. O tempo para adesão celular foi pré-determinado adotando os dados da literatura (Teng et al.<sup>73</sup>, 2012) para avaliar a adesão inicial das células.

#### ***Avaliação da viabilidade celular (MTT)***

A análise da viabilidade celular foi realizada por meio da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Esse método é baseado na habilidade das mitocôndrias ativas em células vivas em converter o composto sal de metiltetrazolium em um produto insolúvel, o cristal de formazan. A enzima desidrogenase succínica das

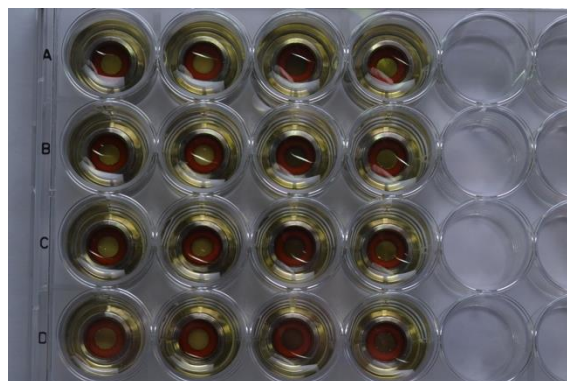
células viáveis cliva a estrutura do sal de tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), produzindo cristais de formazan de coloração arroxeada (Mosmann<sup>52</sup>, 1983).

Após a adesão celular, o meio foi removido e sobre os discos de cada material citado acima, uma solução contendo 900  $\mu\text{L}$  de meio de cultura KSFM e 100  $\mu\text{L}$  de solução de MTT- Metiltetrazolium (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 5 mg/ml de PBS, foi aplicada em cada sobre cada corpo de prova dentro compartimento (Figuras 18 e 19).

**Figura 18-** Aplicação de solução de MTT sobre os corpos de prova.

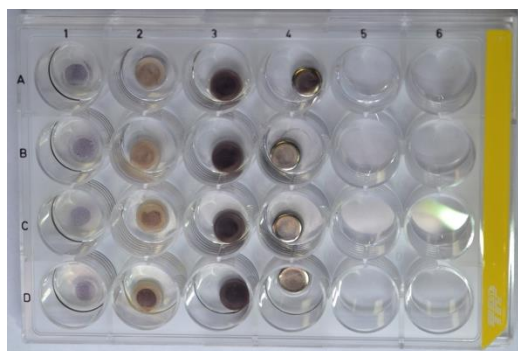


**Figura 19-** Compartimentos preenchidos com solução de MTT.

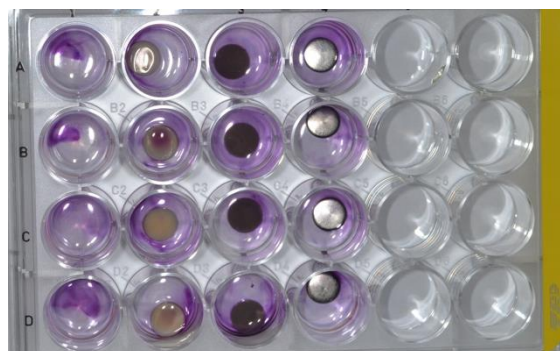


As células imersas nesta solução foram incubadas por 4 horas a 37°C. Em seguida, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado, os anéis de silicone e metálicos foram removidos (Figura 20) e cada compartimento recebeu 400  $\mu\text{L}$  de solução de isopropanol acidificado em HCl a 0,04 N para solubilizar os cristais formados pela degradação dos cristais de formazan (Figura 21).

**Figura 20-** Aspecto dos corpos prova após remoção dos anéis.

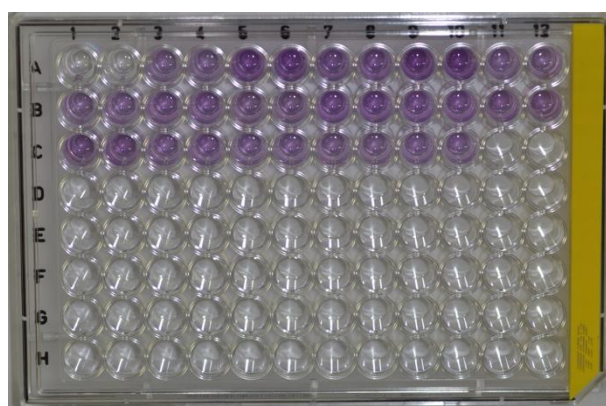


**Figura 21-** Aspecto após solubilização com isopropanol.



A viabilidade celular foi determinada por meio da avaliação da absorbância a 570 nm em leitor de ELISA (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader – Biotek, USA). Para tal finalidade, duas alíquotas de 100  $\mu$ L de cada compartimento foram removidas e colocadas em outra placa com 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) (Figura 22). Os resultados foram obtidos por meio da média em valores numéricos de acordo com a absorbância das alíquotas de cada compartimento.

**Figura 22-** Placa de 96 compartimentos para avaliação da viabilidade celular pela absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA



### ***Análise da morfologia celular por Microscopia Eletrônica de Varredura***

Por meio de microscópio eletrônico de varredura (Philips – XL 30 FEG) foi realizada a avaliação da morfologia das células aderidas (Räsänen et al.<sup>58</sup>, 2000)

sobre os espécimes após os períodos de 1 e 24 horas (Teng et al.<sup>73</sup>, 2012). Os anéis metálicos foram cuidadosamente removidos e as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% por 2 horas. Posteriormente à fixação inicial das células, estas foram submetidas a lavagens em PBS, seguidas de pós-fixação com 200  $\mu$ L de tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos. A seguir, as células foram lavadas com água destilada e desidratadas com soluções crescentes de etanol 30%, 50%, 70%, 95%, 100%. Finalmente, as amostras foram submetidas a secagem química com 200  $\mu$ L de 1,1,1,3,3,3,- Hexamethyldisilazane, 98% (HMDS, ACROS Organics, New Jersey, NY, USA), fixados em *stubs* metálicos (Figura 23) e com as células aderidas foram colocados por 7 dias em dissecador (Figura 24).

**Figura 23-** Discos fixados em *stubs*.



**Figura 24-** Amostras dentro do dissecador



### **Análise Estatística**

Os dados de ângulo de contato foram submetidos aos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, para comparação dos grupos aos pares, uma vez que não apresentaram distribuição normal.

Os dados de viabilidade celular (MTT) apresentaram aderência a curva normal (Kolmogorov-Smirnov,  $p=0,072$ ) e os grupos a serem comparados apresentaram homocedasticidade (Levene,  $p=0,696$ ). Portanto, foi aplicado a esses dados o teste de ANOVA a dois critérios fixos (“material” e “período de análise”). As inferências estatísticas foram baseadas no nível de significância de 5%.



---

*Resultado*

## RESULTADO

### Preparação das amostras

- ***Padronização da Rugosidade Superficial***

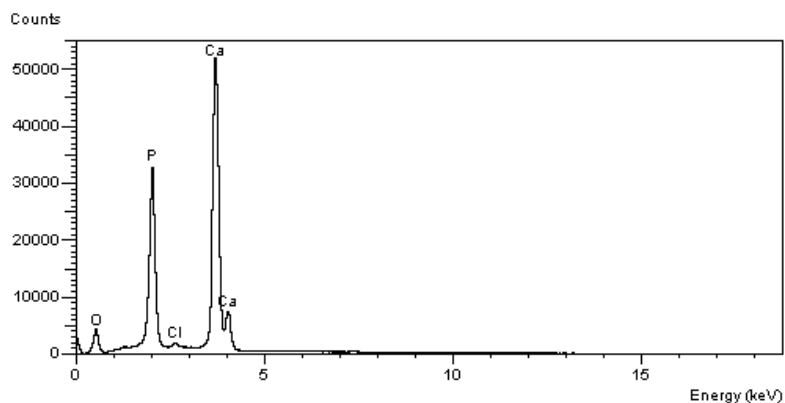
A rugosidade superficial da lamínula de vidro variou entre 0,03 e 0,06  $\mu\text{m}$ . Em relação à rugosidade superficial do esmalte bovino, a mesma foi padronizada entre 0,05 a 0,1  $\mu\text{m}$ , ou seja, todos os discos que conferiram valores fora deste padrão, não foram utilizados no experimento. A rugosidade do titânio variou entre 0,09 a 0,33  $\mu\text{m}$ . Os corpos de prova que apresentaram valores acima de 0,34  $\mu\text{m}$  foram excluídos. A média e desvio padrão obtidos para este material foram, respectivamente: 0,15  $\mu\text{m} \pm 0,04 \mu\text{m}$ . Para a zircônia, a rugosidade variou entre 0,1 a 0,34  $\mu\text{m}$ . Da mesma forma que para o titânio, todos os corpos de prova que apresentaram valores acima de 0,35  $\mu\text{m}$ , foram excluídos. A média e desvio padrão obtidos para a zircônia foram, respectivamente: 0,16  $\mu\text{m} \pm 0,04 \mu\text{m}$ . A reprodutibilidade intra examinador foi avaliada cálculo do ICC, com um intervalo de confiança de 95% para os discos de titânio 0,560 ( $p=0,006$ ) e zircônia com 0,534 ( $p=0,008$ ).

- ***Espectrômetro de raios-X por Dispersão de Energia (EDS) em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)***

#### ***Esmalte Bovino***

O EDS identificou os elementos Cálcio (Ca), Fósforo (P), Cloro (Cl), Oxigênio (O) na composição química do esmalte bovino (Figura 25).

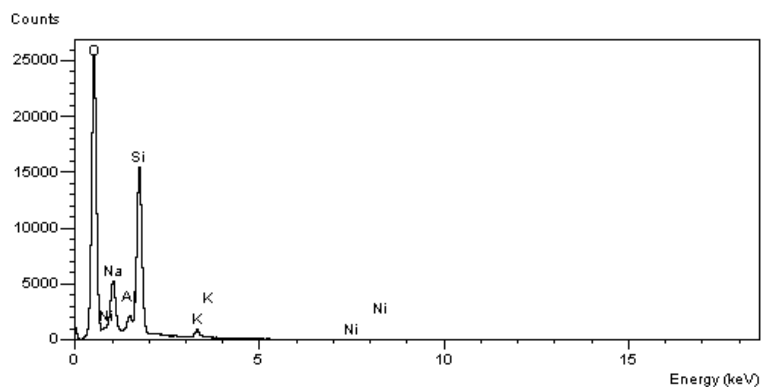
**Figura 25-** Composição do disco de esmalte bovino por EDS (MEV).



### ***Lamínula de Vidro***

A imagem abaixo mostra os elementos químicos, em ordem decrescente, identificados na lamínula de vidro: Oxigênio (O), Silício (Si), Sódio (Na), Alumínio (Al), Potássio (K) e mínima quantidade de Níquel (Ni) (Figura 26).

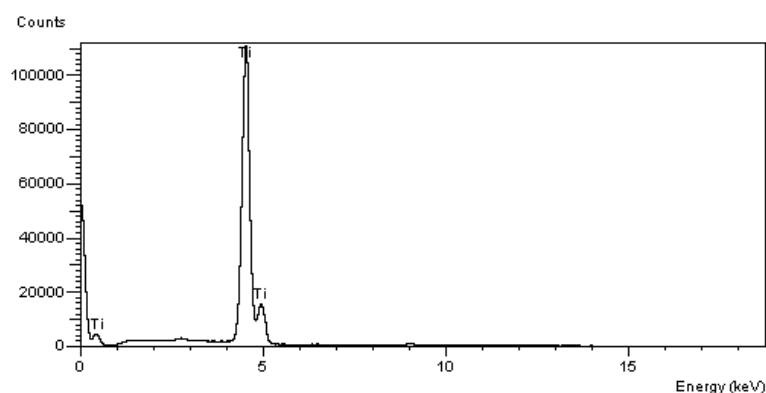
**Figura 26-** Composição da lamínula de vidro por EDS (MEV).



### ***Titânio***

Para os discos de titânio comercialmente puro, o EDS identificou presença somente do titânio (Ti) (Figura 27).

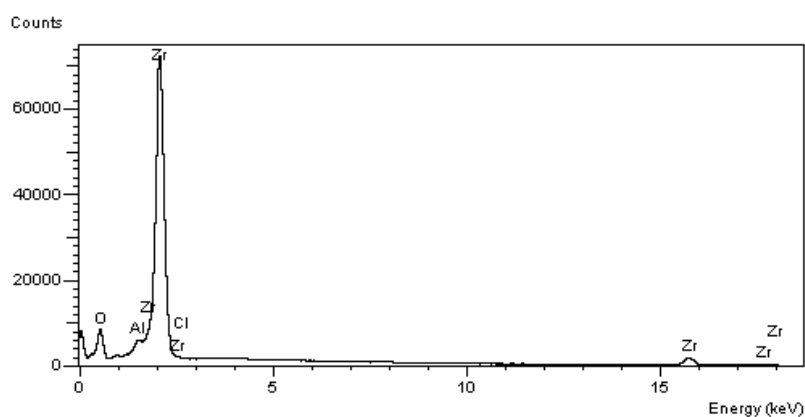
**Figura 27-** Composição do titânio por EDS (MEV).



### **Zircônia**

Em se tratando da zircônia, foi observado principalmente Óxido de Zircônio (Zr), Oxigênio (O), Alumínio (Al) e Cloro (Cl) (Figura 28).

**Figura 28-** Composição da zircônia por EDS (MEV).

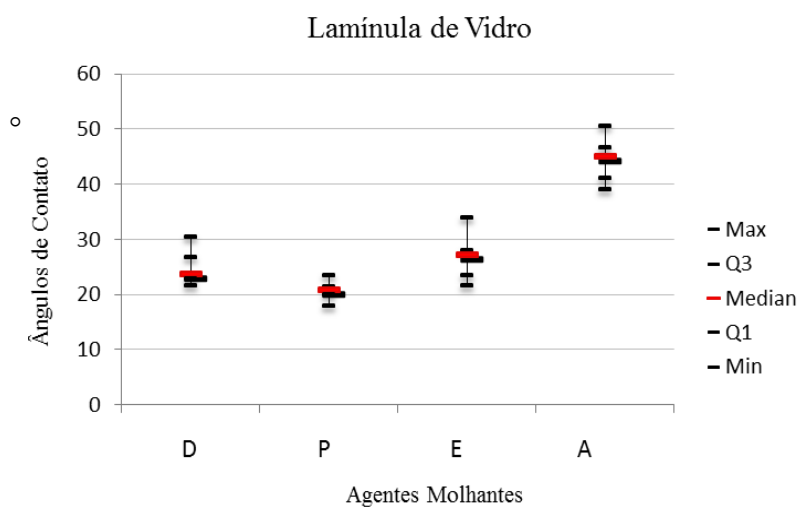


- **Energia Livre de Superfície (ELS)**

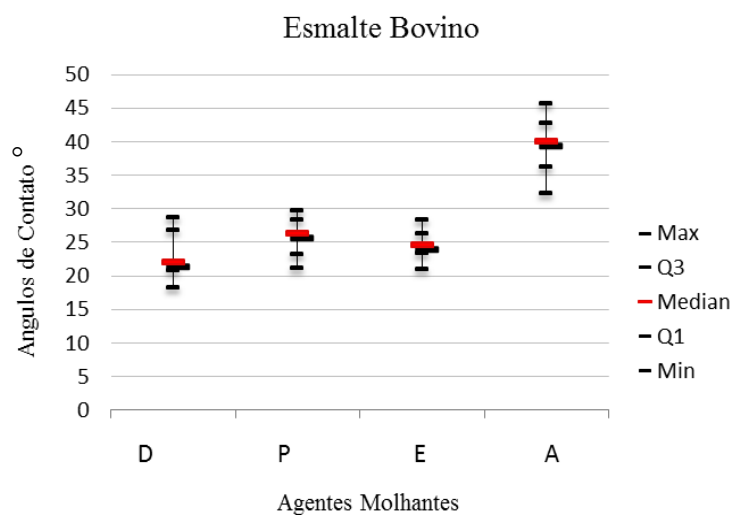
Os Gráficos 1, 2, 3 e 4 mostraram não ter havido diferenças estatisticamente significante em relação aos ângulos de contato dos líquidos: diiodometano, polietilenoglicol e etilenoglicol para cada superfície analisada. Em se tratando da água destilada, os valores de ângulo de contato foram significativamente maiores m comparação aos demais líquidos para todos os materiais. Quando comparamos os materiais entre si, observamos que para a água, líquido de maior polaridade, os ângulos de contato se apresentam significativamente maiores para a zircônia e para

o titânio, ou seja, a água destilada tem menor molhamento quando em contato com estas superfícies, o que as define como superfícies hidrofóbicas.

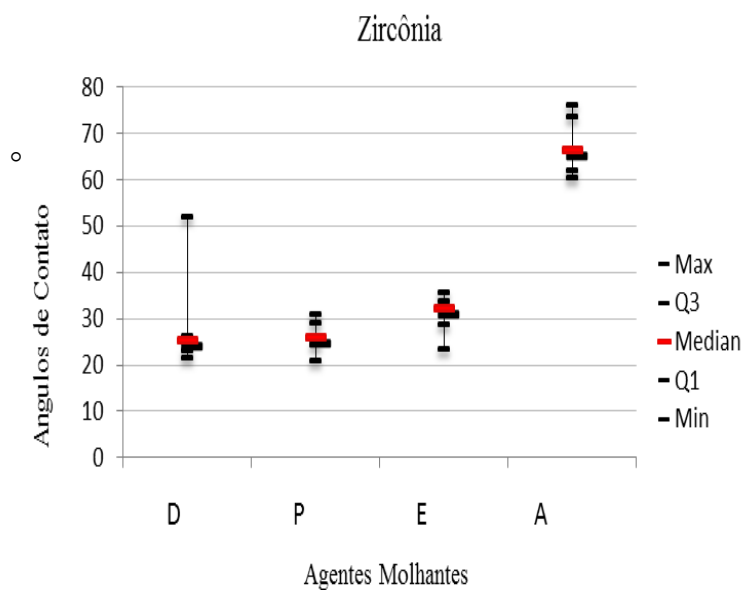
**Gráfico 1-** Diagrama de caixas mostrando a relação das medianas dos ângulos de contato dos quatro agentes molhantes: diodometano (D), polietilenoglicol (P), etilenoglicol (E) e água destilada (A), na superfície LV.



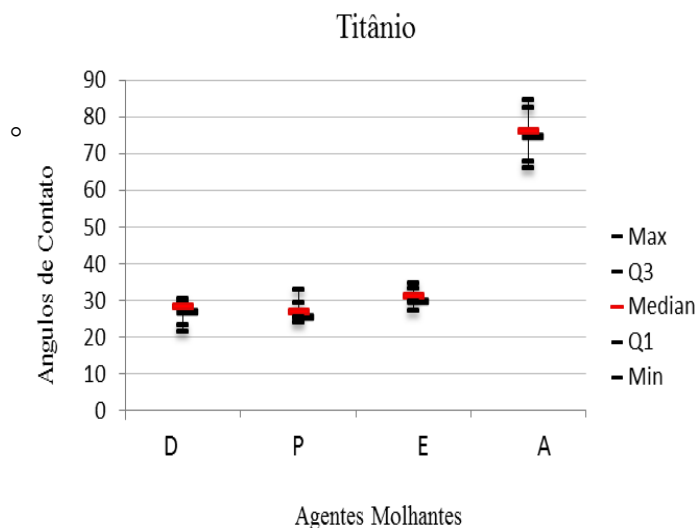
**Gráfico 2-** Diagrama de caixas mostrando a relação das medianas dos ângulos de contato dos quatro agentes molhantes: diodometano (D), polietilenoglicol (P), etilenoglicol (E) e água destilada (A), na superfície EB.



**Gráfico 3-** Diagrama de caixas mostrando a relação das medianas dos ângulos de contato dos quatro agentes molhantes: diodometano (D), polietilenoglicol (P), etilenoglicol (E) e água destilada (A), na superfície  $ZrO_2$ .



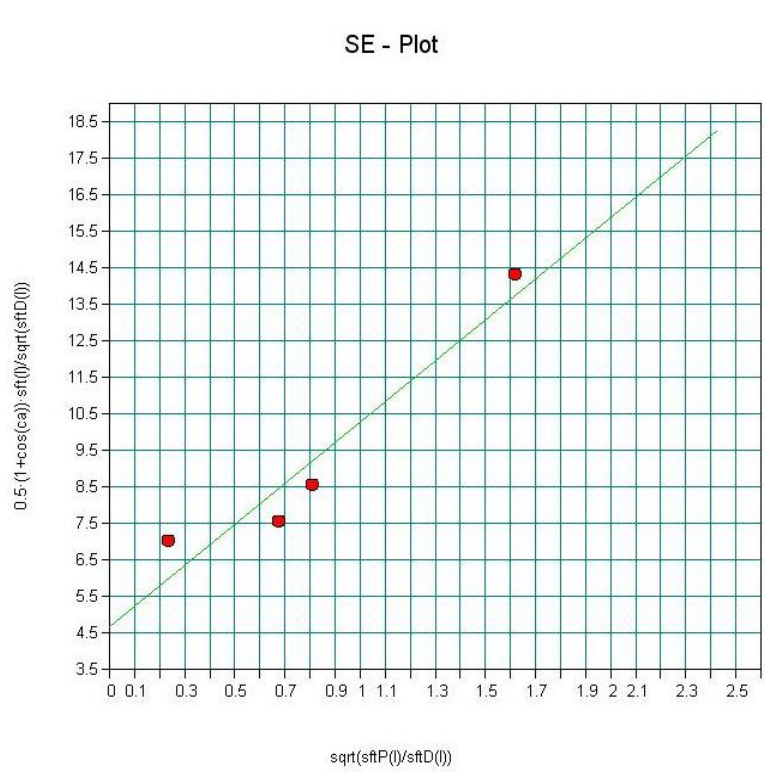
**Gráfico 4-** Diagrama de caixas mostrando a relação das medianas dos ângulos de contato dos quatro agentes molhantes: diodometano (D), polietilenoglicol (P), etilenoglicol (E) e água destilada (A), na superfície T.



Os valores das medianas foram inseridos no programa SCA20 - DataPhysics (Instruments GmbH, Filderstadt, Baden-Württemberg, Alemanha) para obtenção da energia livre de superfície pelo método de OWRK (Owens, Wendt, Rabel e Kaelble) - determinação de polaridade e contribuições de dispersão para energia de superfície de aplicação universal.

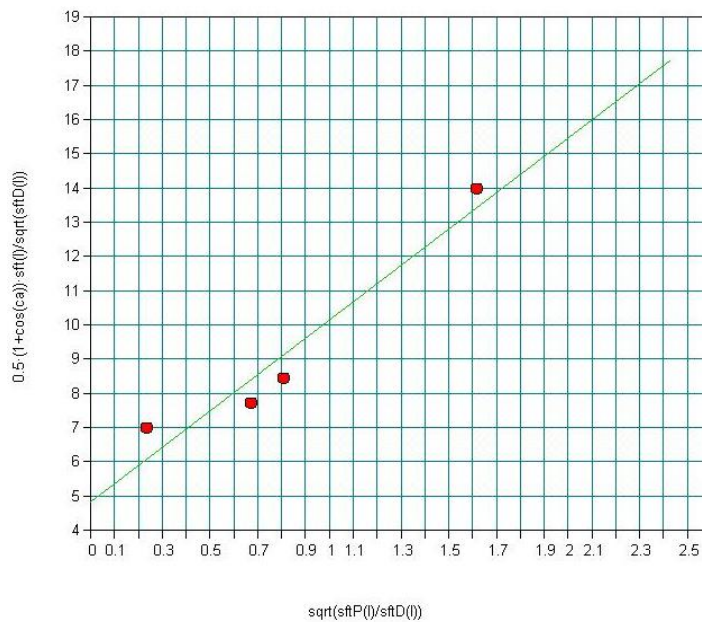
Os Gráficos 5 a,b,c,d mostram o comportamento dos agentes molhantes sobre os materiais e os valores de Energia Livre de Superfície para: a. esmalte bovino, b. lamínula de vidro, c. zircônia e d. Titânio.

**Gráfico 5a- Esmalte Bovino**



**Gráfico 5b- Lamínula de Vidro**

SE - Plot

**Gráfico 5c- Zircônia**

SE - Plot

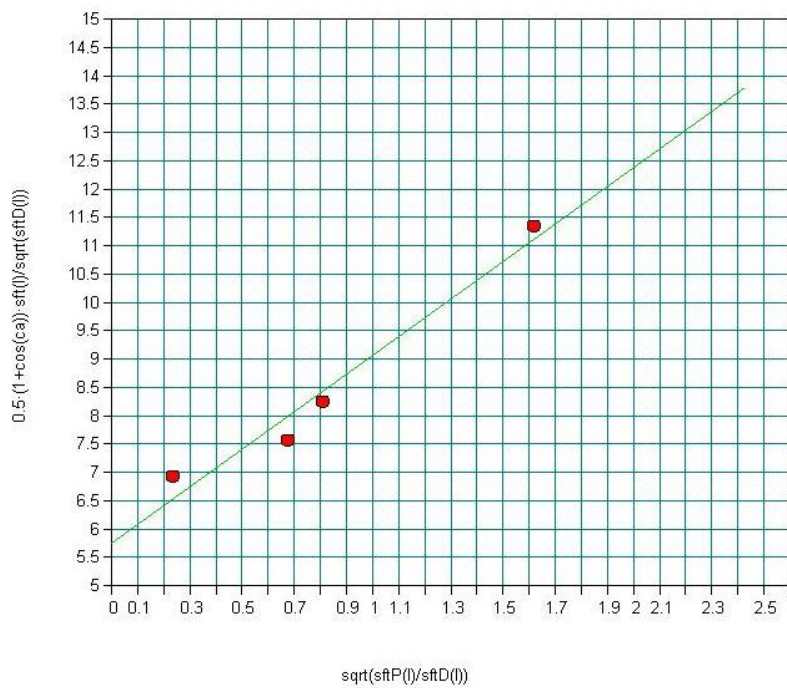
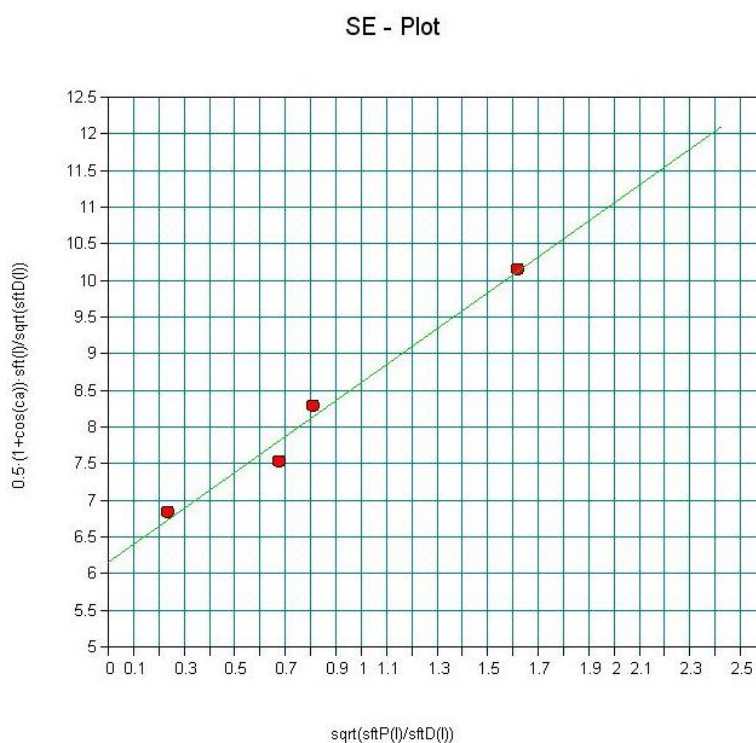


Gráfico 5d- Titânio



A tensão superficial é determinada pelo cruzamento da reta na direção do eixo y. O valor referente a este cruzamento define o coeficiente linear da reta e portanto, a energia de livre de superfície, ou energia de Gibbs de superfície. Quanto maior a tensão superficial, maior será o valor desta energia. Neste contexto, de acordo com os gráficos acima, o titânio apresentou maior valor de ELS: 6,2N/m; consequência das forças de interação intermoleculares mais elevadas na superfície do material aumentando a tensão superficial. O esmalte bovino apresentou o menor valor de tensão superficial: 4,7N/m. Considerando o comportamento dos líquidos sobre a superfície deste material, e o fato de a natureza química do líquido e da superfície interferirem diretamente nos resultados de ângulos de contato, é possível concluir que o EB apresenta características hidrofóbicas e hidrofílicas identificadas pelo comportamento uniforme dos 4 líquidos utilizados e do resultado final da ELS.

## Após adesão celular

- **Viabilidade Celular (MTT)**

Após a aplicação do teste ANOVA a dois critérios fixos, foi observado que os fatores material ( $p=0,336$ ) e período de análise ( $p=0,400$ ) não apresentaram efeito sobre os dados de viabilidade celular, assim como a interação entre eles (material\*período de análise,  $p=0,559$ ). Portanto, a viabilidade das células epiteliais gengivais OBA-9 não foi afetada pelo tipo de material sobre o qual foram cultivadas. Da mesma forma, não houve alteração dessa viabilidade quando comparadas com os períodos de análise pós-contato de 1 ou 24 horas.

Os dados de viabilidade celular estão apresentados numericamente na Tabela 2 e representados graficamente na Figura 29.

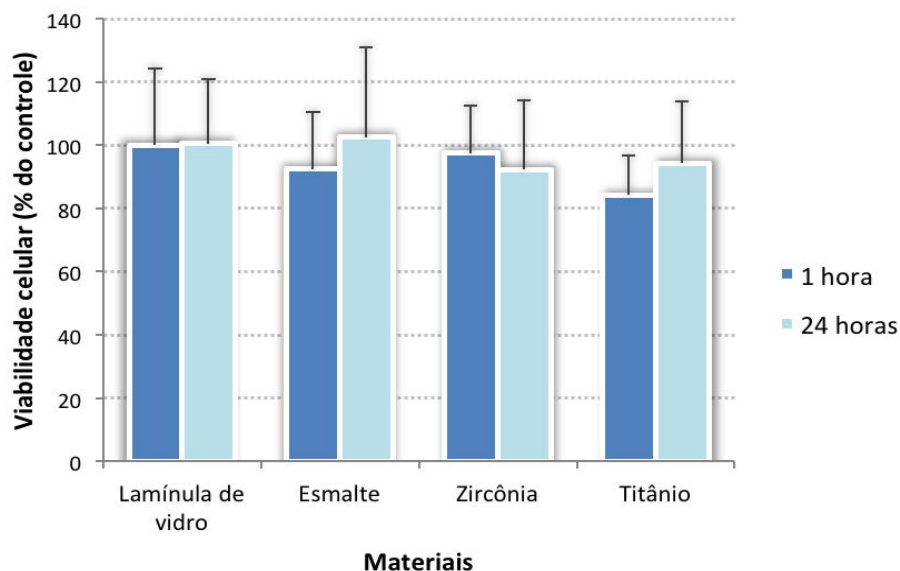
**Tabela 2** - Viabilidade de células epiteliais gengivais OBA-9 (% do controle-LV) após 1 ou 24 horas do contato com diferentes materiais.

<b>MATERIAL</b>	<b>PERÍODO DE ANÁLISE</b>	
	<b>1 hora</b>	<b>24 horas</b>
Lamínula de vidro (C)	100,0±24,3	100,5±20,4
Esmalte dentário	92,5±18,0	102,5±28,5
Zircônia	97,4±15,1	92,3±21,8
Titânio	84,2±12,7	94,2±19,6

Valores representam média  $\pm$  desvio - padrão,  $n=11$ . Não houve diferença estatística entre os materiais ou períodos de análise.

Para o teste MTT, não houve diferença estatística entre nenhum dos materiais ou períodos de análise, ou seja, aceita-se a hipótese nula ( $H_0$ ), de não haver diferença na adesão entre os diferentes tipos de materiais para abutments, titânio e zircônia, e em relação ao controle (LV).

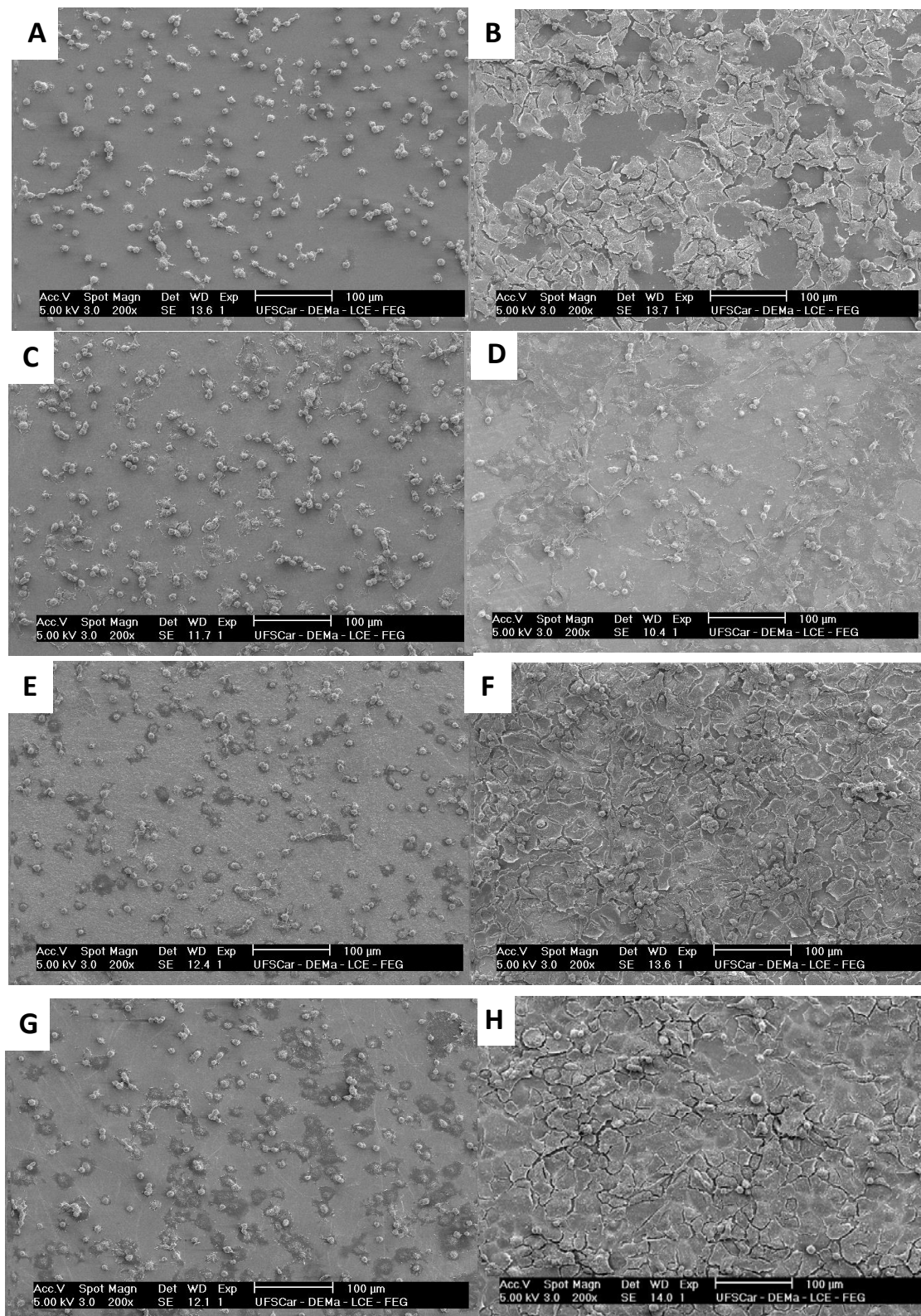
**Figura 29-** Viabilidade de células epiteliais gengivais OBA-9 (% do controle-LV) após 1 ou 24 horas do contato com diferentes materiais. Colunas representam as médias e barras de erro representam os desvios-padrões, n=11. Não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos e períodos de análise.



- **Microscopia Eletrônica de Varredura**

A Figura 30 (A – LV/1 hora; B – LV/24 horas; C – EB/1hora; D – EB/24horas; E – ZrO2/1hora; F – ZrO2/24horas; G – T/1hora; H – T/24horas) mostra a morfologia das células epiteliais gengivais OBA-9 cultivadas sobre as superfícies. As células cultivadas por uma hora estavam aderidas as superfícies, porém ainda apresentavam uma morfologia arredondada e sem projeções. No entanto, para o período de 24 horas após o cultivo celular as células apresentaram melhor adesão aos substratos avaliados, e melhor espraiamento sobre tais substratos. A densidade celular, qualitativamente, se apresentou maior nos substratos com maiores rugosidade e ELS (titânio e zircônia).

**Figura 30-** Morfologia das células epiteliais após 1 / 24 horas de adesão aos diferentes substratos (A – LV/1 hora; B – LV/24 horas; C – EB/1hora; D – EB/24horas; E – ZrO<sub>2</sub>/1hora; F – ZrO<sub>2</sub>/24horas; G – T/1hora; H – T/24horas). MEV, magnificação original x 200.





---

*Discussão*

## DISCUSSÃO

Para o tratamento com próteses implanto suportadas, sobretudo em área estética, a preservação e/ou a correção do contorno do tecido mole ao redor do abutment torna-se um desafio para os profissionais. A integridade do tecido peri-implantar depende da relação, dentre outras, das células epiteliais gengivais com a superfície de abutment (Rompen et al.<sup>60</sup>, 2006). Sendo assim, o presente estudo avaliou, *in vitro*, a influência das características físicas e químicas de duas superfícies de abutments de implantes no comportamento de células epiteliais gengivais. O presente estudo aceitou a hipótese nula, de que não houve diferença estatisticamente significativa entre a adesão de células OBA-9 e o tipo de superfícies utilizadas.

As características físico-químicas avaliadas foram a rugosidade superficial e a energia livre de superfície. A literatura científica mostra que estas propriedades influenciam diretamente na adesão e espalhamento celular (Jansen et al.<sup>35</sup>, 1999; Rompen et al.<sup>60</sup>, 2006), ou seja, as propriedades geométricas da superfície do substrato estão diretamente relacionadas sobre a forma e direção da locomoção de células de cultura, o que já era conhecido desde os primeiros estudos (Dunn, Heath<sup>23</sup>, 1976).

As habilidades das células em estágios iniciais, como adesão e proliferação de substratos podem variar de acordo com a topografia de superfície que influenciam componentes do citoesqueleto celular (Teng et al.<sup>73</sup>, 2012). No estudo em questão, o valor em média da rugosidade superficial dos discos de titânio, zircônia, esmalte bovino e lamínula de vidro foram: de 0,15  $\mu\text{m}$ , 0,16  $\mu\text{m}$ , 0,07  $\mu\text{m}$ , e 0,04  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Apesar de haver diferença entre os resultados, a adesão das células às superfícies não foi influenciada pela rugosidade quando analisadas pelo método quantitativo (MTT). Isto pode ser justificado pelo fato de a literatura relatar que a rugosidade abaixo de 0,2  $\mu\text{m}$ , representa um valor limiar de rugosidade média abaixo do qual pode ser observada produção de resposta celular (Clark et al.<sup>14</sup>, 1987) e todas as amostras apresentaram valores médios inferiores a 0,2  $\mu\text{m}$ . Em concordância, Hormia et al.<sup>32</sup> (1991) compararam a fixação e

disseminação de células epiteliais gengivais humanas em três superfícies de titânio diferentemente processadas (eletropolidas, condicionadas e jateadas), por meio de imunomarcção. Os resultados mostraram que as células epiteliais aderiram e se espalharam mais facilmente em titânio polido e condicionado comparado as superfícies mais rugosas (titânio jateado), concluindo que a rugosidade pode interferir na adesão celular. Em 2005, Baharloo et al.<sup>6</sup>, evidenciaram o efeito da rugosidade do titânio no crescimento e espalhamento das células epiteliais. Os resultados mostraram menor adesão destas células na superfície de maior rugosidade sugerindo que as células são mais susceptíveis a remoção mecânica. De acordo com Rompen et al.<sup>60</sup>, 2006, as superfícies de titânio lisas ou apresentando finas ranhuras são consideradas ótimas para manutenção da adesão de células epiteliais gengivais (Rompen et al.<sup>60</sup>, 2006).

Da mesma forma que a rugosidade superficial, a energia livre de superfície também influencia na qualidade da adesão celular e no comportamento desta. O efeito da química de superfície sobre o comportamento de células aderentes é uma área-chave de pesquisa e o conhecimento destas características contribui para o entendimento dos resultados. Os resultados deste estudo mostraram não ter havido diferenças estatisticamente significantes para os líquidos diiodometano, polietilenoglicol e etilenoglicol para todas as superfícies. Os líquidos em questão apresentam menor polaridade e, uma vez que os ângulos de contato entre o agente e a superfície apresentaram valores inferiores a 50 graus, pode-se concluir que os materiais admitem características lipofílicas (Van Oss et al.<sup>76</sup>, 1995). Estas características podem ser mais bem compreendidas pelo método de EDS que identifica a presença de elementos químicos que conferem cargas às moléculas presentes nos materiais. Os resultados dos ângulos de contato com a água destilada, como agente molhante, mostram que a LV e o EB, também apresentam características hidrofílicas e este efeito, também, pode ser compreendido por meio dos elementos químicos identificados: cálcio e fosforo no EB; e sílica, sódio, alumínio e potássio na LV. Da mesma forma que os líquidos, as células apresentam diferentes polaridades conferidas de acordo com a composição química da membrana plasmática (Rodriguez-Boulan, Macara<sup>59</sup>, 2014). Neste caso

em questão, o fato de as células terem se espalhado sobre as superfícies da mesma forma que os líquidos com menor polaridade, é possível sugerir que a constituição da membrana apresenta características mais hidrofóbicas. Não obstante, as superfícies de abutments de implantes deveriam apresentar características hidrofóbicas para permitir e manter a adesão de células epiteliais gengivais. Embora o papel das características físico-químicas tenha sido investigado por mais de três décadas, o mecanismo exato da influência na adesão celular ainda é incerto. Alguns autores sugerem que a molhabilidade da superfície, influencia o estado conformacional das proteínas adsorvidas pelo substrato (Ziats et al.<sup>79</sup>, 1990; Iuliano et al.<sup>33</sup>, 1993; Jansen et al.<sup>35</sup>, 1999). A camada de proteína adsorvida é depositada em ilhas de acordo com a especificidade destas proteínas com o material em questão. Menor quantidade de ilhas iria resultar em menos locais de adesão celular (Ziats et al.<sup>79</sup>, 1990; Iuliano et al.<sup>33</sup>, 1993; Jansen et al.<sup>35</sup>, 1999).

Em relação à energia livre de superfície, o titânio foi o material que apresentou maior valor de tensão superficial. A ELS representa a tensão superficial de cada material, e quanto maior esta tensão, maior o número de íons ativados disponíveis sobre esta superfície. Por conseguinte, isto interferiria na adesão favorecendo o contato celular, desde que as células em questão apresentassem a mesma natureza química que a superfície. Os resultados mostraram não ter havido diferença estatisticamente significativa entre viabilidade celular nos quatro materiais avaliados. Contudo, a análise qualitativa da morfologia celular mostrou um maior número de células aderidas e espreiadas as superfícies de titânio e zircônia, ou seja, superfícies com maiores valores de ELS, sugerindo ter havido uma influência desta característica sobre as células estudadas. Em concordância, alguns autores também destacam a ELS como um fator importante na determinação da adesão de células epiteliais gengivais, já que uma relação entre a energia livre da superfície e o estado conformacional das proteínas adsorvidas é sugerido com a conformação biologicamente ativa nas superfícies de alta energia (Colvin<sup>15</sup>, 1983; Jansen et al.<sup>35</sup>, 1999; Rompen et al.<sup>60</sup>, 2006).

Após a adesão celular, foram avaliadas a viabilidade celular por MTT e a morfologia das células por MEV. Para a análise da viabilidade celular (MTT), os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre a adesão de células epiteliais gengivais sobre os diferentes materiais de abutments, titânio e zircônia, e entre estes e os grupos controles (lamínula de vidro e esmalte bovino). Da mesma forma, os dois períodos avaliados (1 e 24 horas) não mostraram interferirem na adesão das células sobre as 4 superfícies, por meio do MTT. Por tratar-se de um estudo *in vitro*, não ocorre contato direto entre as células e entre estas e a superfície do material. As células aderem a uma camada intermediária de moléculas de matriz extracelular depositada. A adesão das células gengivais OBA-9 ocorre por meio de forças físico-químicas não específicas, pois o meio de cultura utilizado para manutenção dessas células é isento de soro fetal bovino (Jansen et al.<sup>35</sup>, 1999). Isto pode explicar o fato de não ter havido diferença entre a adesão as células OBA-9 entre os grupos e períodos.

Por outro lado, o método de análise MEV, mostrou ter havido diferenças entre a morfologia das células sobre as superfícies e em relação aos dois períodos avaliados. Em uma hora as células mostraram conformação arredondada e poucas projeções, provavelmente porque neste período as células decantaram e apenas iniciaram mudanças no citoesqueleto para se aderirem às superfícies (Teng et al.<sup>73</sup>, 2012). Já em 24 horas, as células foram capazes de se aderirem e mudar a morfologia com maior número de projeções para espriarem-se sobre a superfície. Apesar de o MTT não ter mostrado diferenças em relação à viabilidade celular em ambos os períodos, a diferença encontrada no MEV pode ser justificada pelo fato de que 1 hora não foi suficiente para as células se proliferarem, somente para decantarem e aderirem e espriarem. Os resultados encontrados estão de acordo com o estudo de Linkevicius, Apse<sup>45</sup>, em 2008. Nesta revisão sistemática, os autores analisaram a estabilidade de materiais de abutments de implantes em relação aos tecidos peri-implantares e observaram semelhança nos resultados entre o titânio e a zircônia em contato com tecidos moles e duros. Em concordância, Nakamura et al.<sup>53</sup>, em 2010, mostraram, por meio de uma revisão sistemática, que as dimensões dos tecidos moles peri-implantares ao redor do

abutment de zircônia foram similares as de titânio. Em 2012, Teng et al.<sup>73</sup>, estudaram a relação entre células e superfícies para desenvolver uma arquitetura apropriada dos tecidos sobre titânio puro, com diferentes tratamentos e variando a rugosidade. Neste trabalho, os autores avaliaram a fase inicial de adesão e a capacidade de repovoamento celular de: osteoblastos (MC3T3-E1), fibroblastos (NIH 3T3), e das células epiteliais (XB-2). Os resultados mostraram que as qualidades adesivas das células XB-2, após 1 hora, foram melhores em uma superfície polida comparado as superfícies rugosas. Já para o período de 24 horas, as propriedades proliferativas foram invertidas, ou seja, as células proliferaram mais em superfícies rugosas. Os autores concluíram que a superfície ótima para o implante deve apresentar uma superfície lisa na área superior, mais próxima da superfície gengival, com o objetivo de promover a rápida adesão celular epitelial e prevenir a inflamação após a implantação.

Dada à relevância clínica do estudo em questão, apesar das limitações experimentais intrínsecas no estudo in vitro, mais estudos são necessários para avaliar tanto o comportamento das células epiteliais gengivais sobre superfícies utilizadas como componentes protéticos quanto à qualidade deste contato com as mesmas superfícies, analisando outras propriedades como por exemplo. Ao mesmo tempo, compreender como estas superfícies agem interferindo na arquitetura do tecido peri-implantar.



---

*Conclusão*

## CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, considerando a metodologia in vitro utilizada e de acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que não houve diferença entre a adesão celular para os diferentes materiais de abutments de implantes, titânio e zircônia, e períodos avaliados.

- Os grupos titânio e zircônia apresentaram maiores valores de rugosidade e energia livre de superfície quando comparados ao esmalte bovino e lamínula de vidro.
- A rugosidade e a energia livre das superfícies não interferiram na adesão das células epiteliais e o espraiamento celular foi qualitativamente maior nas superfícies mais rugosas e com maior ELS.
- A viabilidade das células epiteliais gengivais não foi influenciada pelo tipo de material ou período (1 e 24 horas).
- A análise da morfologia celular mostrou que as células aderidas às superfícies de titânio e zircônia apresentaram espraiamento semelhante, sendo este maior quando comparado as superfícies de esmalte bovino e lamínula de vidro.



---

## *Referências*

## REFERÊNCIAS\*

1. 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.
  2. Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue response to plaque formation at different implant systems. A comparative study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1998; 9(2): 73–9.
  3. Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Linder E, Wennerberg A, Lindhe J. The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(5): 448–55.
  4. Andersson B, Odman P, Lindvall AM, Lithner B. Single-tooth restorations supported by osseointegrated implants: results and experiences from a prospective study after 2 to 3 years. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995; 10(6): 702–11.
  5. Andrade Junior ACC, Carvalho L, Stumbo AC, Machado WAS, Fischer RG. Proliferação in vitro de fibroblastos sobre superfícies de titânio quimicamente modificadas. *Periodontia.* 2007(1); 17: 16-20.
  6. 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.
  7. 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.
  8. 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.
-

\*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

9. Bollen C M L, Papaioannou W, Van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, Van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7(3): 201-11.
10. Botero JE, González AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *J Periodontol.* 2005; 76(9): 1490-5.
11. Brodbeck U. The ZiReal Post: a new ceramic implant abutment. *J Esthet Restor Dent.* 2003; 15(1): 10-23.
12. 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(2): 156–64.
13. 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.
14. Clark P, Connolly P, Curtis AS, Dow JA, Wilkinson CD. Topographical control of cell behaviour. I. Simple step cues. *Development.* 1987; 99(3): 439–48.
15. Colvin RB. Fibrinogen–fibrin interactions with fibroblasts and macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408: 621–33.
16. Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials.* 1997; 18(24):1573-83.
17. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol 2000.* 2002; 30: 70–8.
18. 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.
19. Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater.* 2008; 24(3): 299–307.

20. 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(3): 289–95.
21. Di Iorio D, Traini T, Degidi M, Caputi S, Neugebauer J, Piattelli A. Quantitative evaluation of the fibrin clot extension on different implant surfaces: an in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 74(1): 636–42.
22. 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): 390–7.
23. Dunn GA, Heath JP. A new hypothesis of contact guidance in tissue cells. *Exp Cell Res.* 1976; 101(1): 1-14.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.

30. Hisbergues M, Vendeville S, Vendeville P. Zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 88(2): 519-29.
31. Holst S, Blatz MB, Hegenbarth E, Wichmann M, Eitner S. Prosthodontic considerations for predictable single-implant esthetics in the anterior maxilla. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63 (9 suppl 2): 89–96.
32. 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 Periodontal Res*. 1991; 26(6): 491–7.
33. 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.
34. 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.
35. Jansen JA, Den Braber ET, Walboomers XF, De Ruijter JE. Soft tissue and epithelial models. *Adv Dent Res*. 1999; 13: 57-66.
36. 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.
37. Kajiya M, Komatsuzawa H, Papantonakis A, Seki M, Makihiro S, Ouhara K, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans Omp29 Is Associated with bacterial entry to gingival epithelial cells by F-Actin rearrangement. *PLoS One*. 2011; 6(4): e18287.
38. Kawahara H, Kawahara D, Hashimoto K, Takashima Y, Ong JL. Morphologic studies on the biologic seal of titanium dental implants. Report I. In vitro study on the epithelialization mechanism around the dental implant. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13(4): 457-64.

39. Kawahara H, Kawahara D, Mimura Y, Takashima Y, Ong JL. Morphologic studies on the biologic seal of titanium dental implants. Report II. In vivo study on the defending mechanism of epithelial adhesion/ attachment against invasive factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13(4): 465–73.
40. Kloss FR, Steinmüller-Nethl D, Stigler RG, Ennemoser T, Rasse M, Hächl O. In vivo investigation on connective tissue healing to polished surfaces with different surface wettability. *Clin Oral Impl Res*. 2011; 22(7): 699–705.
41. Kohal R, Weng D, Bächle M, Strub JR. Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment. *J Periodontol*. 2004; 75(9): 1262-8.
42. Kononen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res*. 1992, 26(10): 1325–41.
43. Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi M, T Nozaki, et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *J Periodontol*. 2004; 75(3): 370-9.
44. Lima EMCX, Koo H, Smith AMV, Del Bel Cury AA. Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Clin Oral Impl Res*. 2008; 19(8): 780–5.
45. Linkevicius T, Apse P. Influence of abutment material on stability of peri-implant tissues: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008; 23(3): 449–56.
46. Listgarten MA, Buser D, Steinemann SG, Donath K, Lang NP, Weber HP. Light and transmission electron microscopy of the intact interfaces between non-submerged titanium-coated epoxy resin implants and bone or gingiva. *J Dent Res*. 1992; 71(2): 364–71.
47. Marchi J, Ussui V, Delfino CS, Bressiani AH, Marques MM. Analysis in vitro of the cytotoxicity of potential implant materials. I: Zirconia-titania sintered ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 94(2): 305-11.

48. McKinney RV Jr, 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.
49. Meyle J. Cell adhesion and spreading on different implant surfaces. In: Lang N, Karring T, Lindhe J, editors. *EuroGP 1999. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> European Workshop on Periodontology*; 1999. Berlin: Quintessence; 1999. p. 55-72.
50. Molin MK, Karlsson SL. Five-year clinical prospective evaluation of zirconia-based denture 3-unit FPDs. *Int J Prosthodont*. 2008; 21(3): 223–7.
51. Moon IS, Berglundh T, Abrahamsson I, Linder E, Lindhe J. The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 1999; 26(10): 658–63.
52. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.
53. 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.
54. Nakamura K, Kanno T, Milleding P, Örtengren U. Zirconia as a dental Implant abutment material: a systematic review. *Int J Prosthodont*. 2010; 23(4): 299–309.
55. Oakley C, Brunette DM. Topographic compensation: guidance and directed locomotion of fibroblasts on grooved micromachined substrata in the absence of microtubules. *Cell Motil Cytoskel*. 1995; 31(1): 45-58.
56. 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.

57. 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(3): 138–44.
58. 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(1): 79–87.
59. Rodriguez-Boulan E, Macara IG. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cel Biol.* 2014; 15(4): 225–42.
60. 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.
61. Salvi GE, Furst M.M., Lang NP, Persson GR. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19(3): 242–8.
62. Sardin S, Morrier J, Benay G, Barsotti O. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(2): 140–8.
63. Säuberlich S, Klee D, Richter EJ, Höcker H, Spiekermann H. Cell culture tests for assessing the tolerance of soft tissue to variously modified titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 1999; 10(5): 379–93.
64. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol.* 2004; 75(2): 292–6.
65. Singhvi R, Stephanopoulos G, Wang DIC. Review: effects of substratum morphology on cell physiology. *Biotechnol Bioeng.* 1994; 43(8): 164–71.
66. 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.

67. Springate SD, Winchester LJ. An evaluation of zirconium oxide brackets: a preliminary laboratory and clinical report. *Br J Orthod*. 1991; 18(3): 203-9.
68. Soares DG, Ribeiro APD, Vargas FS, Hebling J, de Souza Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Invest*. 2013; 17(8): 1901-9.
69. Steflik DE, Sisk AL, Parr GA, Lake FT, Hanes PJ. Experimental studies of the implant-tissue interface. *J Oral Implantol*. 1993; 19(2): 90-4.
70. Stern IB. Current concepts of the dentogingival junction: the epithelial and connective tissue attachments to the tooth. *J Periodontol*. 1981; 52(9): 465-76.
71. Swope EM, James RA. A longitudinal study on hemidesmosome formation at the dental implant-tissue overflow. *J Oral Implantol*. 1981; 9(3): 412-22.
72. Takamori ER, Cruz R, Fábio Gonçalves F, Zanetti RV, Artemio Zanetti A, Granjeiro JM. Effect of roughness of zirconia and titanium on fibroblast adhesion. *Artif Organs*. 2008; 32: 305-9.
73. 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; 2012: 687291. doi: 10.1155/2012/687291.
74. Tesmer M, Wallet S, Koutouzis T, Lundgren T. Bacterial colonization of the dental implant fixture-abutment interface: an in vitro study. *J Periodontol*. 2009; 80(12): 1991-7.
75. Umeda JE, D.R. Demuth DR, Ando ES, Faveri M, Mayer MPA. Signaling transduction analysis in gingival epithelial cells after infection with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol*. 2012; 27(1): 23-33.
76. Van Oss CJ, Giese RF. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. *Clays Clay Miner*. 1995; 43(4): 474-7.
77. WenZ HJ, Bartsch J, Wolfart S, Kern M. Osseointegration and clinical success of zirconia dental implants: a systematic review. *Int J Prosthodont* 2008; 21(1): 27-36.

78. Yildirim M, Edelhoff D, Hanisch O, Spiekermann H. Ceramic abutments-a new era in achieving optimal esthetics in implant dentistry. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000; 20(1): 81-91.
79. 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.

Autorizo a reprodução deste trabalho  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 11 de março de 2014.

Maria Sílvia Maurício Rigolin