



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



Maria Sílvia Maurício Rigolin

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

Araraquara

2018



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



Maria Sílvia Maurício Rigolin

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

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior

Araraquara

2018

Rigolin, Maria Silvia Maurício

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

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Molloy Junior

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

Maria Sílvia Maurício Rigolin

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

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de doutor em Reabilitação Oral

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

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

3º Examinador: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

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

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

Araraquara, 10 de julho de 2018.

DADOS CURRICULARES

Maria Sílvia Maurício Rigolin

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

FILIAÇÃO: Celso José Rigolin

Sônia Regina Maurício Rigolin

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

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS... serão muitos!

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUPER OBRIGADA.

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral: o presente estudo avaliou, *in vitro*, a influência do envelhecimento de materiais de *abutments* de implantes em Ti e ZrO₂ em viabilidade, adesão e proliferação de queratinócitos normais orais (Nok-si) e em viabilidade e adesão e morfologia de biofilme multiespécie).

Objetivos específicos: Avaliar a influência nos materiais de superfície de *abutments* Ti e ZrO₂, a rugosidade superficial, a energia livre de superfície e a difração de raio-X antes e após o processo de envelhecimento;

Avaliar o efeito do envelhecimento nas superfícies testadas (Ti e ZrO₂) em viabilidade de células Nok-si por meio do ensaio de redução do MTT, morfologia celular em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), adesão celular destas células por meio de Faloidina em Microscopia de Fluorescência, e proliferação das células aderidas nas superfícies citadas acima por meio de Carboxifluoresceína em Microscopia Confocal.

Avaliar a influência do envelhecimento na adesão e na morfologia de biofilme multiespécie: Fn, Ss, e Pg, por meio do MEV e viabilidade por meio de contagem de células viáveis (UFC/mL).

O estudo experimental testou a hipótese nula de não haver diferença para os diferentes materiais testados antes e após o envelhecimento em relação à adesão, viabilidade e proliferação de células e na viabilidade e adesão de microrganismos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Mesmo com uma osseointegração satisfatória, o sucesso clínico final dos implantes depende da integridade da área peri-implantar⁸. 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-implantite¹⁴. Após a perda dos dentes causada pela doença periodontal, os microrganismos permanecem sobre as estruturas remanescentes e influenciam diretamente a colonização dos implantes, instalados a posteriori, mesmo após a osseointegração ter ocorrido com sucesso¹³.

Abrahamsson et al.⁴⁵, em 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^{19,45}.

Da mesma forma, o tecido peri-implantar age esteticamente circundando o *abutment* e impedindo a penetração de microrganismos e toxinas^{16,46}. 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^{1,19,47-50}. A literatura mostra que os hemidesmosmosos podem ser formados já entre 2 a 3 dias de cicatrização⁵¹.

Já é sabido que diferentes materiais de superfície podem causar vários níveis de tecido peri-implantar duro e mole. Consequentemente, a composição química e as propriedades físicas da superfície dos *abutments* de implantes, ou seja, as características inerentes a cada material podem afetar o comportamento dos tecidos peri-implantares⁵². Devido a capacidade de adesão dos microrganismos nas superfícies de *abutments*⁵³, a barreira formada pelo tecido epitelial ao redor dos *abutments* deve ser efetiva inicialmente para que não ocorra a perda precoce do implante por deficiência no processo de osseointegração e permanecer com esta efetividade ao longo do tempo mesmo com a renovação celular e envelhecimento dos materiais para que não haja a perda tardia, como resultado de doença peri-implantar.

A peri-implantite é um processo inflamatório sendo um sítio específico de infecção que acomete os tecidos que circundam implantes dentais osseointegrados, resultando na perda do suporte ósseo ao redor do implante. Essa condição se desenvolve em resposta à colonização bacteriana do sulco peri-implantar e, se não for tratada, leva a perda do osso de suporte, perda da osseointegração e insucesso do implante. Comumente acomete entre 5% e 10% dos pacientes tratados com implante e é uma das causas principais de insucesso do implante a longo prazo⁵⁴.

A infecção bacteriana dos biomateriais é o fator mais importante para a falha de próteses implanto suportadas^{12,55}, desta forma, a adesão bacteriana inicial e o adicional desenvolvimento de biofilme complexo multi bacteriano sobre a superfície do biomaterial é um problema clínico comum⁵⁶. A adesão da bactéria a superfícies sólidas depende de muitos fatores, inclusive das características bacterianas, fatores ambientais, e das propriedades de superfície do biomaterial⁵⁷.

Os materiais utilizados para a confecção de *abutments* são o Ti e atualmente a ZrO₂. Em relação à característica química, o titânio é um dos materiais mais comumente utilizado em implantes dentários principalmente pela biocompatibilidade. Além de ser considerado padrão-ouro como material de *abutment* e de implante, adsorve proteínas, como a albumina, colágeno, fibronectina e fibrinogênio dos fluídos biológicos da cavidade bucal²⁵.

Desde a sua introdução, o Ti tem ocupado uma posição dominante como material de implante e pilar para terapia com implantes dentários, e estudos clínicos de longo prazo de Ti puro comercialmente puro disponíveis demonstraram um resultado previsível⁴⁴. No entanto, o Ti também apresenta desvantagens, incluindo a cor cinza, que pode descolorir a mucosa peri-implantar fina (<2 mm) (Jung et al., 2007) baixa resistência ao desgaste (Taira et al., 2009) e partículas submicrométricas de Ti que induzem a secreção inflamatória de citocinas in vitro⁵⁸.

A demanda por restaurações estéticas favoreceu a introdução de *abutments* de cerâmica, principalmente em casos de gengiva fina e pouco queratinizada⁷. Entre estes, os pilares de ZrO₂ demonstraram excelentes propriedades mecânicas e estéticas, levando à sua popularidade como uma alternativa aos pilares de Ti^{7,44,59}. Essas propriedades mecânicas e micro estruturais da ZrO₂, assim como a biocompatibilidade, têm sido bem documentadas^{60,61}.

A ZrO₂, à temperatura ambiente, apresenta três formas: monoclínica, estável até cerca de 1170°C; tetragonal, de 1170°C até 2370°C; e cúbica de 2370°C até a

temperatura de fusão (2680°C)⁶². Em altas pressões e temperaturas ou após resfriamento rápido até temperaturas próximas ou inferiores à do nitrogênio líquido observa-se a estrutura ortorrômbica.

A transformação da fase t-m acabará ocorrendo após a aplicação do estresse local⁶³ e na presença de água^{63,64}, que é conhecido DBT⁶⁵.

A adesão de células epiteliais e a qualidade da barreira formada dependem das propriedades físico-químicas dos materiais, tais como: rugosidade superficial, hidrofiliabilidade e energia livre de superfície. As células epiteliais exigem polaridade na membrana plasmática apical-basal para realizar funções de transporte vetorial cruciais e polaridade citoplasmática para gerar diferentes progênies celulares para morfogênese do tecido. O estabelecimento e a manutenção de uma célula epitelial polarizada com domínios superfície apical, basolaterais e ciliar é guiado por um programa de polaridade epitelial (PPE), que é controlado por uma rede de reguladores de proteínas e lipídios. O PPE é organizado em resposta a sinais extracelulares e é executado através do estabelecimento de um eixo apical-basal, junções intercelulares, rearranjos do citoesqueleto específicas do epiteliais e máquinas tráfico polarizada⁶⁶.

Sendo assim, a sensibilidade ao envelhecimento deve ser especificamente determinada para cada componente protético, uma vez que o envelhecimento é primariamente dependente das características micro estruturais^{37,38} e características superficiais^{63,67-69}.

No caso de *abutments* de implantes, um valor de 0,2 µm 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 mole². De acordo com Quirynen et al.⁷⁰, (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^{9,71}. Ao mesmo tempo, a adesão dessas células em superfícies polidas é maior que em superfícies rugosas^{9,72,73}. É provável que em tratando-se de superfícies rugosas estas mesmas células sejam mais susceptíveis a remoção mecânica. A orientação das células epiteliais in vitro sobre uma determinada superfície se orientam na direção das microranuras da superfície do substrato⁷⁴. Após esta adesão inicial, ocorreria um subsequente aumento da ligação entre estes 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 celular⁸.

Interações hidrofóbicas e hidrofílicas desempenham um importante papel na adsorção de proteínas sobre superfícies de biomateriais e influenciam na relação destes com o tecido humano, no caso o gengival, e na adesão de microrganismos^{75,76}. Assim, outra característica influente na adesão celular é a energia livre de superfície ou tensão superficial. A alta energia disponível reflete a presença de grupos iônicos expostos sobre o material, e esta carga resultante determinará as interações intermoleculares com a interface celular⁷⁷.

Assim como a superfície de um material, as células também expressam uma grande variedade de moléculas na superfície externa. Os grupos químicos presentes nestas moléculas interagem entre si, por meio das interações intra moleculares, e também geram uma carga final⁷⁸. As regiões hidrofóbicas da interface celular refletem a tendência da célula a ser atraída às regiões com a mesma natureza química, o mesmo ocorre em caso de superfícies hidrofílicas. Desta forma, a energia livre de superfície 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^{8,17}. De acordo com Colvin et al.⁷⁹ (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. Contudo, as interações que conduzem a adesão inicial, mas principalmente, a longo prazo de células epiteliais às superfícies, ainda são pouco compreendidas, já que é preciso considerar a magnitude das cargas apresentadas pelo tecido, as quais também são influenciadas pelas condições proporcionadas pelo meio, como alteração de pH^{80,81}.

Abrahamsson et al.⁴⁵ (1998), compararam a reação dos tecidos peri-implantares em *abutments* de Ti, liga de ouro, e de óxido de alumínio e *abutments* individualizados com porcelana dental em cães. Os *abutments* produzidos tanto com Ti quanto com cerâmica, permitiram a formação de uma porção de tecido epitelial e uma porção conjuntiva de cerca de 2 e 1,5 mm, respectivamente. Concluíram que as características químicas dos diferentes materiais influenciaram o comportamento celular e conseqüentemente na adesão sobre as superfícies.

Em 2005, Glauser et al.¹⁶ 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). 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). Em conclusão, os implantes oxidados e condicionados permitiram menor crescimento epitelial e maior vedação dos implantes usinados com tecido conjuntivo.

Em uma revisão sistemática, Linkevicius, Apse²⁶ (2008) analisaram as informações disponíveis quanto ao fato de *abutments* de Ti promoverem uma maior estabilidade para os tecidos peri-implantares, em comparação com *abutments* de ouro, de ZrO₂ e de alumínio e concluíram que os *abutments* de Ti não proporcionam um nível mais elevado de osso em comparação com *abutments* de ouro, alumínio e ZrO₂. Em estudos histológicos realizados em animais, o Ti e a ZrO₂ 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 ZrO₂ em comparação com o Ti. Em concordância, Nakamura et al.²⁴, em 2010, realizaram uma revisão sistemática e mostraram que a ZrO₂ é o material adequado para confecção de *abutment* quando comparado ao Ti, uma vez que as dimensões dos tecidos moles peri-implantares ao redor da ZrO₂ mostraram superioridade quando comparadas ao metal.

Em 2012, Teng et al.⁵² estudaram a relação de células/implantes para desenvolver uma arquitetura apropriada dos tecidos sobre superfícies de Ti 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 taxas de sucesso de implantes. 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 implantação⁵².

Rigolin et al.⁷⁶, em 2017 avaliaram, in vitro, a influência das características físico-químicas de duas superfícies de pilares de implantes sobre a adesão de células

epiteliais gengivais (OBA-9). Para este fim, foram utilizados espécimes em forma de disco de Ti e ZrO₂, imitando as superfícies dos componentes do pilar, enquanto discos de esmalte bovino (EB) e lamínula de vidro (LV) serviram como controles positivos e negativos, respectivamente. A rugosidade e a energia livre de superfície (ELS) de todos os materiais foram avaliadas previamente ao passo de adesão celular. Em sequência, o efeito de cada material na morfologia e viabilidade das células foi analisado após 1 e 24 h. Os resultados mostraram que a rugosidade e a ELS não tiveram efeito sobre os dados de viabilidade celular ou sobre sua interação ($p < .559$), independente de uma análise pós-contato de 1 ou 24 horas. No entanto, a fixação e o espalhamento das células aumentaram após 24 horas em Ti e ZrO₂ em relação a EB, correspondendo aos maiores valores de ELS. A ELS parece ser uma propriedade importante que interfere na qualidade do tecido mole ao redor dos implantes dentários. Esses dados podem ser considerados um ponto de gatilho para o desenvolvimento de novas superfícies de materiais.

No entanto, não é de interesse para a longevidade do implante que haja adesão de microrganismos periodontais no *abutment*, já que isso pode levar a peri-implantite. Pier-Francesco et al.¹¹, em 2006, objetivaram modificar rugosidade e energia livre de superfície do Ti e identificar o efeito dessas modificações na aderência bacteriana subsequente. Para isto, 16 amostras de Ti de diferentes rugosidades foram preparadas usando procedimentos de polimento específicos. Outras seis amostras foram quimicamente alteradas pelo tratamento com descarga de plasma de argônio e imersão em soluções de silano para produzir diferentes hidrofobias de superfície. Um ensaio de adesão in vitro utilizando *Porphyromonas gingivalis* foi realizado para avaliar o efeito da modificação na aderência bacteriana. Encontraram, redução significativa na adesão a materiais categorizados como sendo "muito lisos" ($Ra\ 34,57 \pm 5,79\text{ nm}$). Esta redução não ocorreu com superfícies "lisas" ($Ra\ 155,00 \pm 33,36\text{ nm}$), "rugosas" ($Ra\ 223,24 \pm 9,86\text{ nm}$) ou "muito rugosas" ($Ra\ 449,42 \pm 32,97\text{ nm}$). A alteração na hidrofobicidade da superfície do material também não foi encontrada para afetar a adesão bacteriana. Assim concluíram que a adesão de *P. gingivalis* ao Ti foi inibida a níveis de rugosidade superficial abaixo daqueles geralmente encontrados para *abutments*/pilares de implante ($Ra\ 350\text{ nm}$).

Em 2013, Al-Ahmad et al.⁸², examinaram in vivo a adesão bacteriana inicial em seis diferentes materiais de implantes, Ti-m, TiUnite1, ZiUnite1, ATZ-m, ATZ-s, TZP-A-m, que foram testados utilizando placas de esmalte bovino como controle. Todos os

materiais, fixados em sistemas splint, foram examinados após 30 min e 120 min de exposição oral. A coloração com DAPI foi utilizada para análise quantitativa dos microrganismos inicialmente aderentes. Os microrganismos aderentes iniciais foram visualizados por hibridação in situ com fluorescência (FISH) e quantificados por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). Os alvos das sondas oligonucleóticas foram *Eubacteria*, *Veillonella spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus spp.* Como resultados, a análise DAPI mostrou que o aumento do tempo de exposição oral resultou em uma quantidade crescente de bactérias aderentes iniciais. O maior nível de colonização foi em ZiUnite1, com o menor ocorrendo no esmalte bovino, seguido por Ti-m. Esta colonização precoce correlacionou-se significativamente com as rugosidades superficiais dos materiais. FISH e CLSM não apresentaram diferenças significativas em relação à composição bacteriana total. No entanto, *Streptococcus spp.* foi mostrado para ser os principais colonizadores em cada um dos materiais investigados. Pode-se demonstrar que, em um tempo de exposição oral de 30 min e 120 min, a influência direta ou indireta da topografia da superfície do material é influenciada principalmente. Superfícies altamente polidas devem minimizar o risco de formação de biofilme, acúmulo de placa e possivelmente peri-implantite.

Avila et al.¹⁵, em 2017, avaliaram in vitro o efeito de 2 materiais para *abutment* de implante disponíveis comercialmente na fase de adesão e formação de biofilme. Utilizaram discos (8 mm de diâmetro, 2 mm de espessura) de Ti puro usinado (Ti) e materiais de ZrO₂ estabilizada com ítria (ZrO₂) para imitar os *abutments* dos implantes. As propriedades físico-químicas da superfície foram investigadas usando diferentes abordagens. Bactérias com adesão inicial e formação de biofilme foram avaliadas após 16 e 48 horas incubando os discos em um meio rico contendo comunidade microbiana oral derivada de saliva representativa. O Ti apresentou menores valores de hidrofobicidade e energia livre de superfície que o ZrO₂ e 6,1 vezes menos bactérias aderidas ao Ti. Após 48 horas, análises quantitativas detalhadas mostraram que a biomassa do biofilme e a densidade do biofilme foram menores nos discos Ti do que no ZrO₂. Os autores concluíram que embora nenhuma diferença no perfil de bactérias tenha sido observada entre os dois materiais independente do ponto de tempo, o nível mais alto de colonização foi em ZrO₂.

Porém ao longo do tempo o material instalado na boca sofre alterações devido ao processo de envelhecimento, e estudos atuais mostram forte variabilidade da ZrO₂

à degradação in vivo, como uma consequência de uma forte influência deste processo de envelhecimento^{37,38,40,61,83,84}. Preocupações têm sido expressas sobre o efeito do envelhecimento nas propriedades mecânicas da ZrO₂⁸⁵. Mesmo a ZrO₂ estabilizada por ítria (Y-TZP) também pode sofrer transformação da fase tetragonal (t) para monoclinica (m) sem o stress sob certas condições, o que é conhecido como DBT^{40,61}. DBT ou envelhecimento provocam na cerâmica uma transformação de uma estrutura tetragonal metaestável (t) para uma estrutura monoclinica estável (m). Um resumo da literatura da DBT da ZrO₂ é: O processo de degradação ocorre mais rapidamente no intervalo de temperatura de 200-300°C e é dependente do tempo, e a degradação faz com que haja transformação da fase é acompanhada por micro e macro trincas^{40,61}. A transformação tem origem na superfície e progride para o interior. Água ou vapor de água contribuem para a transformação. Uma diminuição no tamanho do grão e um aumento no retardo da transformação do óxido⁶¹.

Atualmente, as taxas de degradação à temperatura ambiente ou corporal da ZrO₂ não estão disponíveis, e os testes acelerados em temperatura intermediária (100–300°C) são a única base para extrapolar uma estimativa da taxa de transformação e, portanto, da vida útil do produto. Esta abordagem baseia-se no pressuposto de que a taxa de transformação segue a mesma tendência semelhante à de Arrhenius até a temperatura ambiente/corporal⁸⁶.

Está bem estabelecido que a transformação t-m começa a partir da superfície da amostra e então prossegue para dentro; provoca uma elevação na superfície^{39,67} e microtrincas⁸⁷ com consequente degradação estética⁸⁸; abre a possibilidade de a água penetrar abaixo da superfície, propagando assim a transformação de t para o interior da amostra⁸⁹; e, finalmente, leva ao desenvolvimento de grandes rachaduras^{86,87}.

Apesar dos *abutments* de ZrO₂ apresentarem resultados promissores, predições de longevidade devem ser feitas com moderação devido ao tempo de acompanhamento relativamente curto na maioria dos estudos clínicos prospectivos e pelo fato de que relatos clínicos de falha catastrófica existem na literatura⁸⁴.

Chevalier³⁸ ressaltou que a ZrO₂ possui forte variabilidade para a degradação in vivo, como consequência da forte influência do processamento no processo de envelhecimento. Como diferentes ZrO₂ de diferentes fornecedores têm diferentes microestruturas relacionadas ao processo, há uma necessidade de avaliar sua sensibilidade ao envelhecimento com técnicas avançadas e precisas. Os resultados

esperados dos métodos convencionais, isto é, difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura são examinados. Métodos mais recentes como interferometria óptica e microscopia de força atômica são apresentados, com seus respectivos benefícios e desvantagens. Uma comparação atualizada dessas diferentes técnicas é fornecida, e seu uso para garantir a confiabilidade a longo prazo de um determinado lote de ZrO_2 em termos de degradação do envelhecimento é demonstrado.

Segundo Lucas et al.⁶¹ (2014) a DBT da ZrO_2 pode produzir aumento da rugosidade da superfície com uma diminuição concomitante na força. Este estudo determinou a eficácia do envelhecimento artificial (ebulição prolongada/autoclavagem) na indução de DBT de Y-TZP e usando envelhecimento artificial para análise da progressão da transformação de fase. A transformação foi medida usando difração de raios X tradicional e difração de raios X de baixo ângulo. A fração transformação da fase t para m aumentou com tempo de envelhecimento. A fervura e no 3,5 dia em autoclave (2bar por 5h) produziram resultados de transformação similares, enquanto que a maior transformação foi no dia 7 de ebulição. A camada de superfície de espécimes com maior envelhecimento sofreu maior transformação enquanto todas as amostras exibiram transformação com menor profundidade. E ainda a transformação de superfície foi mais evidente, podendo levar a superfícies mais ásperas/rugosas e ao aumento do desgaste da dentição oposta/materiais.

Pereira et al.⁴⁰ (2015) avaliaram os efeitos do envelhecimento de baixa temperatura sobre a topografia da superfície, transformação de fase, resistência à flexão biaxial e confiabilidade estrutural de infraestrutura de Y-TZP. Espécimes em forma de disco foram fabricadas e divididas de acordo com dois fatores: desgaste e sem moagem (tal como sinterizado, Ctrl), moagem com uma broca extrafino de diamante (25 μm Xfine) e broca de diamante grosso (181 μm Grosso); e "baixa temperatura de envelhecimento" (ausência ou presença). O envelhecimento foi realizado numa autoclave a 134°C , sob 2bar, durante um período de 20h. Análise da superfície de topografia mostrou um aumento na rugosidade baseado no tamanho do grão (Grosso > Xfine > Ctrl), e envelhecimento promoveu efeitos diferentes sobre a rugosidade (Ctrl Ag < Ctrl; Xfine Ag < Xfine; Grosseiro Ag > grosso). Moagem e envelhecimento promoveram um aumento no valor de fase m, embora tenham sido observadas diferentes susceptibilidades para degradação. Análise Weibull mostrou um aumento na resistência característica após desgaste (Grosso = Xfine > Ctrl); no

entanto, foram observados efeitos distintos para o envelhecimento (Ctrl <Ctrl Ag; Xfine = Xfine Ag; Grosso> Grosseiro Ag). O desgaste promoveu um aumento na resistência característica como resultado de um aumento no teor de fase m; quando a superfície de Y-TZP foi moída por pontas diamantadas grossas seguida pelo envelhecimento, a resistência característica foi reduzida, ou seja, a DBT pareceu intensificar-se para superfícies Y-TZP mais ásperas.

O envelhecimento quando realizado numa autoclave, o efeito da pressão de vapor de água, a temperatura e o tempo decorrido representam uma base para estimar as taxas de degradação do material, e, portanto, sua vida útil⁸⁴. Estima-se que, uma hora nessas condições, corresponderia a dois ou três anos de envelhecimento in vivo³⁸. Segundo Luo et al.⁹⁰ (2016) usar temperaturas baixas ou altas em processos de envelhecimento acelerado podem ter o mesmo efeito nas amostras. Assim, avaliaram as influências do envelhecimento acelerado nas propriedades mecânicas de cerâmica de revestimento usados para infraestruturas de ZrO₂. Foram utilizados 5 tipos de cerâmica de revestimento (n=20) diferentes para as infraestruturas de ZrO₂. Todas as amostras foram divididas em dois grupos. Um foi submetido ao envelhecimento acelerado e o outro foi usado como controle. O envelhecimento acelerado foi realizado em água destilada durante 5 h a 200°C e 2 atm. A densidade, a porosidade aberta, a rugosidade da superfície, a resistência à flexão de três pontos e a dureza Vickers foram medidas. Os resultados mostraram que a densidade, a porosidade aberta, e a rugosidade da superfície de todas cerâmicas de revestimento examinadas foram alteradas pelo processo de envelhecimento acelerado. Envelhecimento acelerado também teve um efeito positivo sobre a resistência e um efeito negativo sobre a dureza.

Segundo Basílio et al.⁸⁴ (2016) a maioria dos pilares cerâmicos são fabricados a partir de Y-TZP. No entanto, Y-TZP sofre degradação hidrotérmica, um processo que não é bem compreendido. Assim os autores tiveram como objetivo avaliar in vitro os efeitos das condições de envelhecimento artificial sobre a carga de fratura, a estabilidade de fase, e a microestrutura da superfície de um pilar de Y-TZP. Análise por difração de raios X (DRX) foi realizada para observar e quantificar a transformação de fase tetragonal-monoclínica (T-M). Não foram encontradas diferenças no processo de degradação de superfície entre os grupos; no entanto, o MEV detectou falhas de superfície induzidas por moagem e microfissuras. Concluiu-se que a resistência à fratura e a estabilidade de fase de pilares de implantes de Y-TZP foram susceptíveis

a condições hidrotérmicas e mecânicas. A microestrutura de superfície de pilares Y-TZP não se alterou após a condições de envelhecimento.

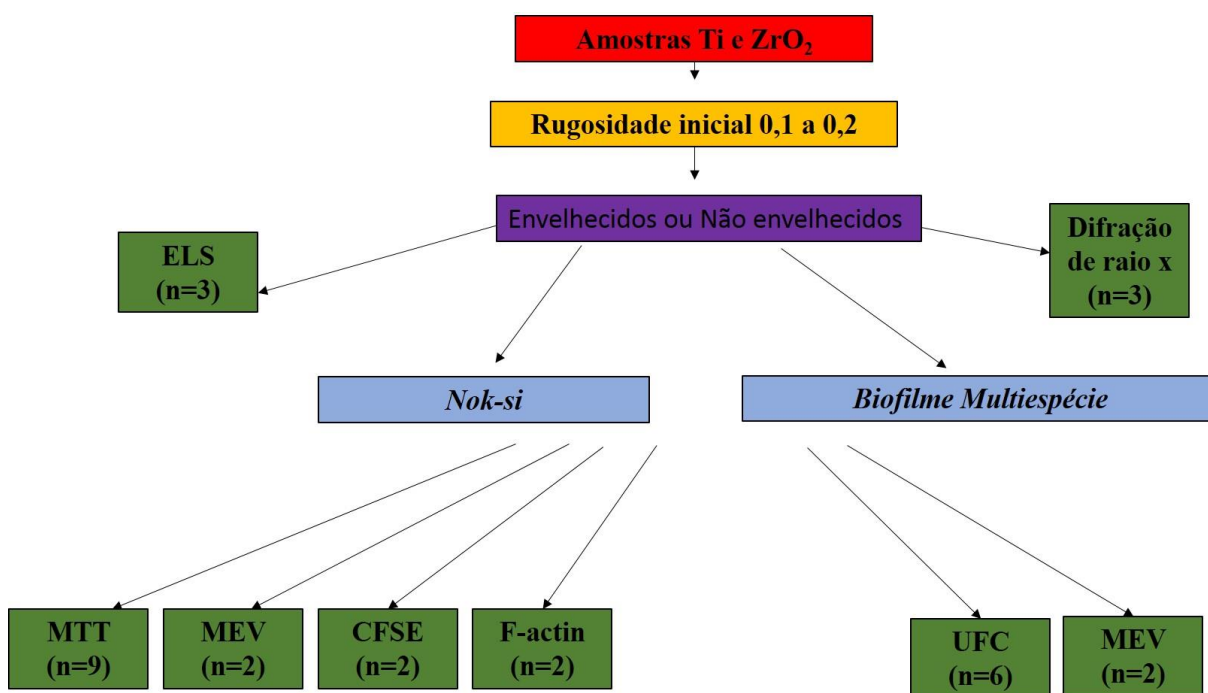
Para melhor elucidar o assunto e fornecer respostas mais precisas quanto a influência do envelhecimento de materiais de *abutments* de implantes em Ti e ZrO₂ na viabilidade, adesão e proliferação de células epiteliais gengivais, e adesão e na morfologia de biofilme estudos adicionais in vitro, ensaios 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 implante⁸. Muitas investigações se concentraram na osseointegração dos implantes dentários⁵⁰, contudo, poucos estudos têm investigado a relação biológica da aderência dos tecidos moles em relação a diferentes superfícies de *abutment* do implante⁵². Uma efetiva barreira tecidual ao redor dos implantes osseointegrados é de suma importância para saúde e longevidade dos implantes, e deve ser mantida com o passar do tempo mesmo com a renovação celular. 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 envelhecimento nas características físicas e químicas de materiais de *abutments* de implantes em Ti e ZrO₂ na viabilidade, adesão e proliferação de células epiteliais gengivais e na adesão e na morfologia de biofilme.

4 MATERIAL E MÉTODO

Discos foram confeccionados nas dimensões 8 mm de diâmetro por 2 mm de espessura, aproximadamente 151 mm² de área total (Lima et al., 2008) de **Titânio comercialmente puro** (Ti) (Conexão Sistemas de Próteses Ltda., Arujá, SP, Brasil) e **Zircônia** (ZrO₂) (Conexão Sistemas de Próteses Ltda., Arujá, SP, Brasil). 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.

Os grupos foram divididos de acordo com o fluxograma apresentado abaixo na figura 1.

Figura 1 – Fluxograma do estudo



ELS= energia livre de superfície; MTT= Viabilidade celular; MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura; CFSE= Carboxifluoresceína; F-actin= Expressão de Faloidina; UFC = Unidade formadora de colônia.

Fonte: Elaboração própria.

4.1 Envelhecimento

Os discos foram submetidos a um envelhecimento em autoclave a 134°C por 20h e pressão de 2 bar⁴⁰ (ISO 14801:2007)⁹¹ em autoclave (Phoenix Luferco) do Laboratório de Cultura de Células e Engenharia de Tecidos da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP. No envelhecimento realizado em autoclave, o

efeito da pressão de vapor de água, a temperatura e o tempo decorrido representam uma base para estimar as taxas de degradação do material, e, portanto, sua vida útil⁸⁴.

Uma vez que a transformação de fase de cristais de ZrO_2 ocorre na presença de água ou vapor, foram utilizados tratamentos de autoclave a vapor a temperaturas aumentadas (120-140°C) para induzir eficazmente DB^{T37,63,92}.

As amostras controle das características físico químicas foram avaliadas na condição como recebida, ou seja, corpos de prova não submetidos ao processo de envelhecimento e sofreram a esterilização por meio de radiação gama, para posterior adesão celular.

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)⁹³.

Para remover qualquer material orgânico aderido à superfície, entre as análises, e antes de esterilizar ou envelhecer os corpos de prova, foi realizada a limpeza dos discos de acordo com o seguinte protocolo:

- 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 destilada⁹⁴.

4.2 Análise das Superfícies

As análises das superfícies de ZrO_2 e Ti foram realizadas por meio das propriedades rugosidade superficial, energia livre de superfície e difração de raio x antes e após o envelhecimento ou esterilização dos discos

4.2.1 Medida da rugosidade superficial (Rugosímetro)

A análise quantitativa da rugosidade superficial dos discos de Ti e ZrO_2 foi realizada pelo rugosímetro portátil (Mitutoyo surftest SJ-400, Mitutoyo Corporation, Japão)^{13,52,95} com: precisão de leitura de 0,01 μ m, comprimento de leitura de 2,5 mm, velocidade da ponta ativa de 0,5 mm/s e raio da ponta ativa de 5 μ m. Para isto, foram utilizados os parâmetros: Ra (rugosidade média)⁹⁶, 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. Utilizando um dispositivo de resina acrílica para estabilizar o corpo de prova, este era posicionado no orifício do dispositivo e a ponta do rugosímetro colocada paralelamente a primeira marcação (Figura 2). Em seguida a leitura foi realizada e em seguida, o corpo de prova colocado na marcação inferior, era realizada a segunda leitura da fase. Este procedimento foi realizado em ambos os lados do disco^{30,76}. Somente os discos que apresentaram reprodutibilidade nas medidas e com rugosidade maior que 0,1 μm e inferior a 0,2 μm foram utilizados no desenvolvimento experimental⁷⁶. Após a avaliação da rugosidade superficial inicial, os discos foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais. Então foram submetidos ao processo de envelhecimento e então analisados a rugosidade novamente nos mesmo discos, caracterizando controle cruzado para esta análise.

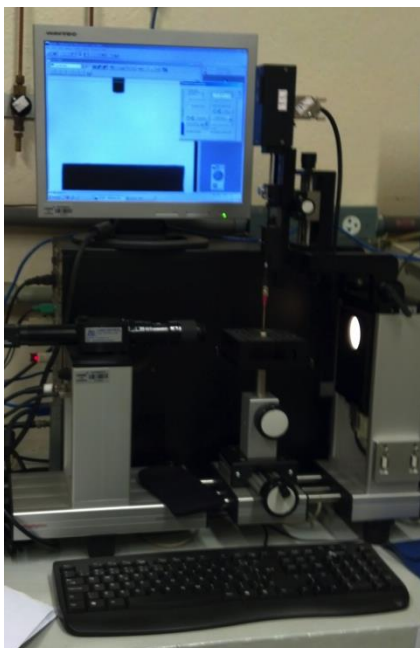
Figura 2 - Disco de Ti posicionado para a leitura da rugosidade superficial



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.2.2 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) (Figura 3) do Instituto de Química de Araraquara-UNESP^{3,52,97,98}.

Figura 3 - Goniômetro Optical Contact Angle Measurements SCA20

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

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. 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. Quando isto ocorre na presença de um líquido polar, é possível definir o tipo de superfície como lipossolúvel, ou hidrofóbica⁹⁷. 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

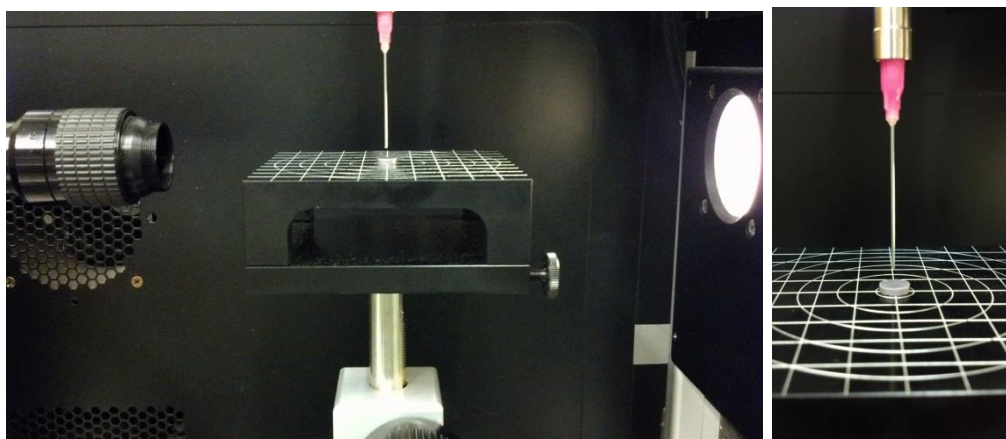
<i>Agente Molhante</i>	<i>Polaridade</i>
Água Destilada	52,5
Etilenoglicol	19,0
Polietilenoglicol	13,6
Diiodometano	2,6

Fonte: Elaboração própria.

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., 2006). Cada corpo de prova de cada material foi posicionado em uma mesa entre a câmera e a lente, e a seringa sobre o corpo de prova (Figura 4)^{30,76}.

Figura 4a - Corpo de prova posicionado no Goniômetro

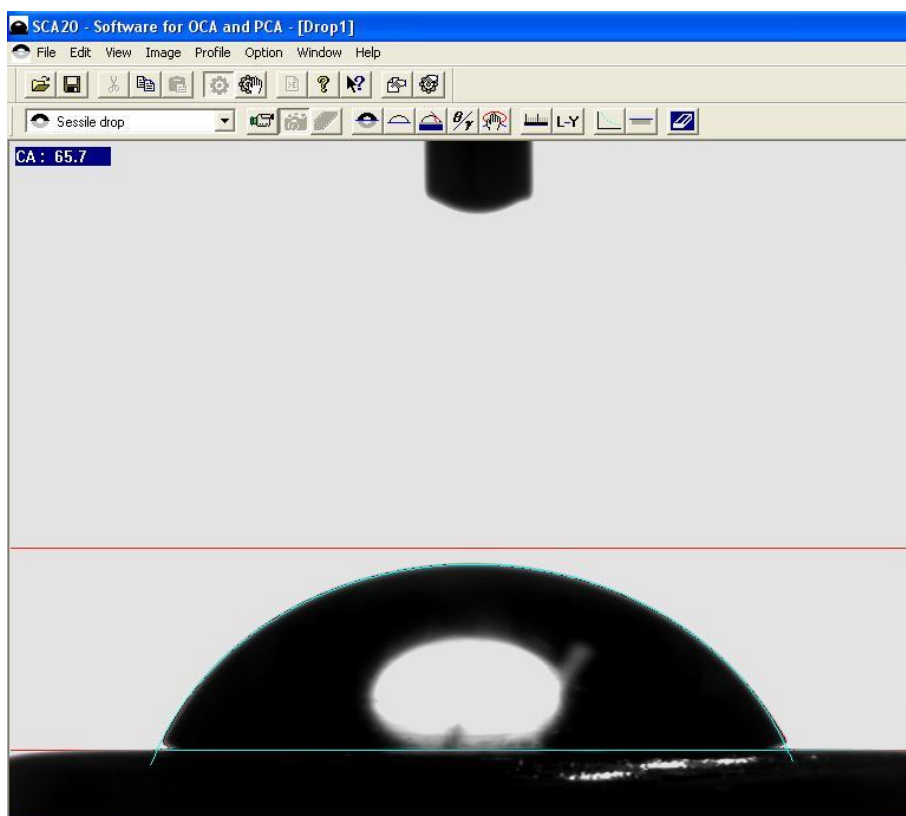
4b- Visão mais aproximada do corpo de prova posicionado no Goniômetro



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

As gotas foram dispensadas. 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. Os ângulos de contato, formados entre a superfície de cada material e a gota correspondente a cada líquido, foram calculados utilizando a equação de Laplace-Young (Figura 5)⁹⁷.

Figura 5 - Superfície de Ti após gota de água destilada ser dispensada



Fonte: Elaboração própria.

Foram utilizadas 3 medidas de cada líquido em Ti e em ZrO_2 , o que se justifica pelo fato de se tratando do mesmo material, os valores dos ângulos de contato não distariam de forma significativa⁹⁷. Para cada material, foram obtidos quatro valores de ângulos de contato, cada um correspondendo a um líquido diferente.

O valor do ângulo de contato é inversamente proporcional a molhabilidade, ou seja, maior o ângulo de contato e menor a molhabilidade do líquido na superfície⁹⁷.

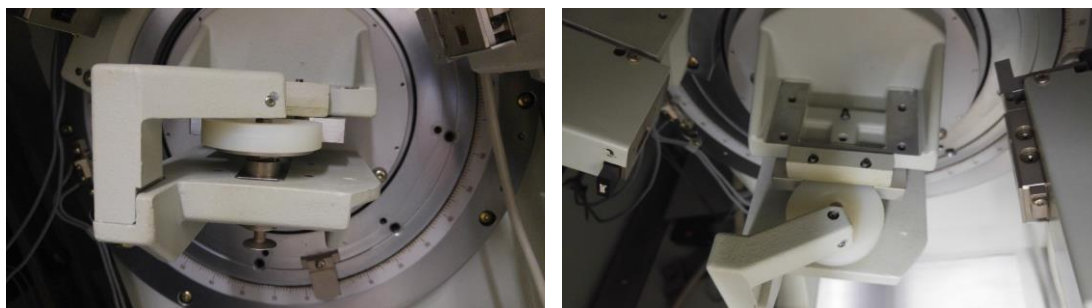
Estes valores foram inseridos em um software para o cálculo da energia livre de superfície utilizando o conceito de componentes polares e dispersão com o método de OWRK (Owens–Wendt–Rabel–Kaelble)⁹⁷.

4.2.3 Difração de raios-X (DRX)

A difração de raios-x foi feita para observar qualquer transformação cristalográfica da ZrO_2 e determinará a constituição da fase cristalina na superfície antes e após o processo de envelhecimento identificando a influência do envelhecimento na superfície. Para caracterizar a estrutura cristalina e possíveis transformações de fase (tetragonal para monoclínica) da ZrO_2 , os discos foram

analisados no difratômetro de raios X (D5000; Siemens DIFFRAC PLUS XRD Commander) do Instituto de Química –UNESP (Figura 6) pela técnica de difração de raios X do pó (DRX), que consistiu na irradiação de superfícies planas com feixe monocromático de Cu-Ka ($1,5418\text{\AA}$) filtrado com níquel, a uma tensão de 40kV e corrente de 30 mA, com varredura contínua para os discos de Ti de símbolo $2\theta = 4^\circ$ a 80° , passo angular de $0,05^\circ$ e tempo de escaneamento de 1s/ponto de contagem. Já para os discos de ZrO_2 $2\theta = 20^\circ$ a 40° , passo angular de $0,01^\circ$ e tempo de escaneamento de 3s/ponto de contagem⁶¹.

Figura 6 - Difratômetro de raios X (D5000; Siemens DIFFRAC PLUS XRD Commander)



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após as leituras, gráficos foram gerados permitindo a observação das fases presentes na ZrO_2 ^{61,69,96}. Já para o Ti a análise foi feita para ter comparação.

4.3 Análise da Adesão, Viabilidade e Proliferação Celular

Foram utilizadas queratinócitos normais orais (NOK-si)⁹⁹, células imortalizadas do tecido gengival advindas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular cedidas pelo do Prof. Carlos Rossa Júnior (Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara –UNESP).

4.3.1 Descongelamento das células

Para a realização dos experimentos, uma alíquota das células NOK-si, armazenada em freezer a -80°C foi transferida para um frasco de cultura celular de 25 cm^2 contendo meio DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Life Technologies). Em seguida, as células foram mantidas em estufa de células a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 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 obtenha a monocamada, com confluência de 80%, atingindo assim o número de células adequado para a execução do projeto⁹⁹.

4.3.2 Cultivo das células NOK-si

As células foram mantidas em meio de cultura DMEM 4,5 g/L de glicose, suplementado com soro fetal bovino, 1000 IU/mL de penicilina, streptomina (10mg/mL) e anfotericina (25µg/mL). Todas as células foram mantidas em incubadora (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) contendo 5% de CO₂ e 95% de ar e foram subcultivadas de acordo com a confluência, até ser obtido o número adequado para a realização da pesquisa⁹⁹.

4.3.3 Adesão celular Nok-si

A adesão celular foi realizada nos corpos de prova para cada material, grupo envelhecido e não envelhecido. 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. Após tripsinização (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) e determinação da densidade celular, foram cultivadas 3×10^4 células/well sobre cada corpo de prova. Os discos permaneceram na placa em contato com queratinócitos orais normais por um período de 24 horas¹⁰⁰. Em seguida, a suspensão celular foi aspirada e foram analisadas a viabilidade através do teste de MTT e a morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura. A adesão e a proliferação celular foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura nos períodos de adesão de 24 e 48 horas. O tempo estabelecido para adesão celular focal foi pré-determinado adotando os dados da literatura¹⁰⁰.

4.4 Avaliação da Viabilidade Celular (MTT)

Foram plaqueadas 3×10^4 células NOK-si sobre os corpos de prova de Ti e ZrO₂, por um período de 24 horas e então o meio de cultivo foi removido, e as células ficaram incubadas com 100 µL de solução diluída de 0,4 de MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich) em solução tampão PBS 1X (NaCl – Cloreto de Sódio, NaHPO₄ – Fosfato de Sódio, NaH₂PO₄ + H₂O – Fosfato

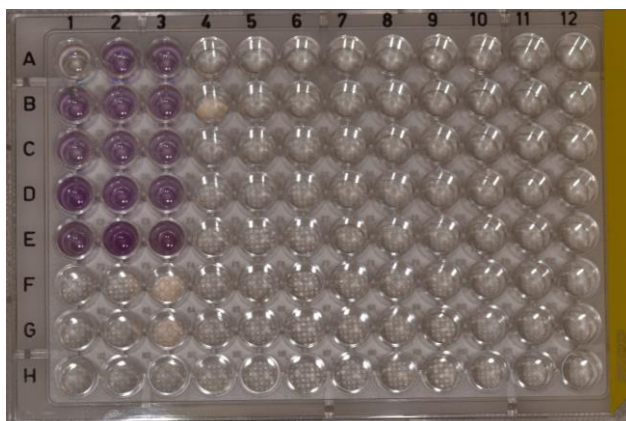
Sódio Monobásico foram adicionados em água Milli-Q) na concentração de 4 mg/mL em meio por 4 horas em estufa a 37°C com 5% CO₂. Removeu-se o MTT (Figura 7) e os cristais de formazan foram solubilizados com 400 µL de isopropanol e então 250 µL de foram transferidos para a placa de 96 poços (Figura 8)⁷⁶.

Figura 7 - Corpos de prova após a adesão celular por 24 horas e remoção do MTT



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 8 - Cristais de formazan solubilizados isopropanol e então transferidos para a placa de 96 poços



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Então, realizou-se a leitura em espectrofotômetro Biochrom em 570nm

Os grupos experimentais Ti e ZrO₂ foram comparados com lamínula de vidro (24mm), para controle positivo em relação às células. A lamínula de vidro por sua vez visa simular as condições ideais de cultura celular, confirmando o metabolismo e a morfologia celular em cada momento experimental^{73,95,101}.

Os experimentos foram realizados em triplicata em três momentos diferentes.

4.5 Análise da Morfologia Celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada a avaliação da morfologia das células aderidas sobre os espécimes após o período de 24 horas de adesão celular sobre as superfícies envelhecidas e não envelhecidas, observando-se assim a morfologia das células aderidas^{76,102}. Após o período de adesão das células, o meio foi sugado, e para a fixação das células 400 µL de solução de glutaraldeído tamponado a 2,5% foi colocado sobre os discos e permaneceu overnight, então os anéis metálicos foram removidos cuidadosamente⁷⁶.

Posteriormente à fixação inicial das células, estas foram submetidas a fixação em glutaraldeído 2,5% (grau analítico) por 1 hora em temperatura ambiente ou por 24 horas a 4°C; 3 lavagens com PBS1x; e sofreram desidratação em soluções crescentes de etanol: Álcool 70% (1 hora); Álcool 90% (1 hora); Álcool absoluto (5 lavagens de 30 minutos cada). Os discos ficaram em dessecador à vácuo com sílica por no mínimo 1 semana; foram metalizados em ouro e fixados nos stubs para análise da morfologia celular em microscópio eletrônico de varredura VEGA 3 TESCAN na Universidade de Franca (UNIFRAN).

Os experimentos foram realizados em dois momentos diferentes.

4.6 Análise de Proliferação Celular com Carboxifluoresceína (CFSE)

CFSE ou carboxifluoresceína - succinimidil - éster, é uma solução de coloração fluorescente de células usadas em estudos de proliferação. Capaz de observar a divisão e assim a proliferação celular, após dois dias.

Para avaliar a proliferação celular de células de Nok-si sobre corpos de prova foram avaliadas em 24 e 48 horas. As células foram lavadas duas vezes com 300 µL de PBS livre de soro; as células foram então libertadas com tripsina (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), e o pellet foi lavado duas vezes com PBS isento de soro. As células foram contadas e 3×10^4 foram coradas com 4,5 µL CFSE (5 µM) (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham) e incubadas em PBS a 37°C em incubadora durante 20 minutos. Em seguida, 60 µL de soro fetal bovino (2%) foram adicionados ao PBS para interromper a reação, e duas lavagens foram realizadas por 5 minutos. As células foram então semeadas sobre cada disco em uma placa de 48 poços e incubadas por 24 e 48 horas. A análise foi avaliada utilizando um Microscópio Confocal Carl Zeiss LSM 800 (linha laser: 488 nm; intervalo de detecção: 520 nm)¹⁰³.

4.7 Análise da Adesão Celular (Nok-si) por Microscopia de Fluorescência

A avaliação da expressão β -actina, que são proteínas as quais participam da adesão celular de queratinócitos orais normais, consistiu num teste de fluorescência direta.

Foram plantadas 3×10^4 células sobre os discos não envelhecidos e envelhecidos de Ti e ZrO_2 ($n = 2$) em placa de 48 poços. Após 24 horas e 48 horas de adesão, os discos foram lavados com 300 μL de PBS (1x), e em seguida as células foram fixadas com 300 μL de paraformaldeído 4% por 20 minutos e lavadas novamente com PBS e, adicionado 110 μL de Triton 0,1% (Sigma-Aldrich, MO, EUA) por 15 minutos. Duas lavagens foram realizadas com PBS, e depois foram adicionadas duas gotas do reagente Faloidina Actin Red (Reagente ActinRed 555 ReadyProbes - Thermo Fisher Scientific, Inc.) sobre cada corpo de prova. Em seguida, adicionou-se 300 μL do marcador nuclear Hoescht 1% (33342, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Inc.) (1:5000 em PBS), que permaneceu durante 10 minutos. As amostras foram lavadas uma vez com 300 μL de PBS e, em seguida, cada amostra permaneceu em 300 μL de PBS até ser realizada a análise. As células marcadas que se mantiveram aderidas foram identificadas e realizada a contagem da fluorescência emitida de β -actina utilizando Microscópio Confocal Zeiss (LSM 800) (comprimento de onda do laser 405 nm: 3.51%; comprimento de onda de detecção: 400-555; ganho de detecção: 896 V; comprimento de onda do laser: 561 nm: 1.10%; %, comprimento de onda de detecção: 555-700; ganho de detecção: 896 V, 630 V).

4.8 Adesão de Microrganismos

Para a adesão de microrganismos, foram utilizadas as cepas padrão *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) para formação de biofilme multiespécie (104–106), visando a simulação do ambiente intraoral, sendo que são estes implicados como agentes etiológicos da perimplantite e periodontite¹⁰⁷.

Os microrganismos foram cultivados em meio de cultura de ágar sangue (Brain Heart Infusion - BHI - Himedia) - com adição de hemina (5 mg/mL) e menadiona (1 mg/mL) (Merck) e 5% de sangue de carneiro em câmara de anaerobiose (85% de N_2 , 10% de H_2 , 5% de CO_2) (Don Whitley - Inglaterra), 37°C ^{92,108}, de acordo com as condições fisiológicas.

4.8.1 Biofilme multiespécie *Pg + Fn + Ss*

A fase logarítmica de crescimento (Log) foi determinada para cada bactéria; assim, as colônias foram transferidas para placas de 96 poços, com um volume final de 200 µL de caldo de Brucella suplementado. As concentrações variaram de 10^7 a 10^9 UFC/mL e, em seguida, nos tempos 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas, com incubação em câmara anaeróbica a 37°C^{15,30,106,108}. Estas placas foram interpretadas com leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595 nm, e os gráficos da curva de crescimento foram traçados no programa Prisma. Assim, determinou-se a melhor concentração e tempo de incubação para a fase Log de cada bactéria. Para o estabelecimento do biofilme misto, os espécimes foram colocados um por poço em uma placa de 48 poços e submersos com 100 µL de caldo Brucella para cada bactéria na concentração 10^9 UFC/mL, totalizando 300 µL (*Pg + Fn + Ss*)^{30,104,109}.

A adesão foi por 72 horas em anaerobiose, tempo correspondente à fase de adesão dos microrganismos à superfície dos espécimes de Ti e ZrO₂ envelhecidos e não envelhecidos. Após o período de adesão, a suspensão celular foi aspirada e cada disco lavado duas vezes com PBS estéril para a remoção de microrganismos não aderidos^{11,13,109}. Em seguida, os discos foram retirados da placa e os protocolos de cada análise foram realizados. Todos os ensaios foram realizados em duplicata em 3 momentos diferentes.

4.9 Quantificação do Biofilme por Contagem UFC/mL

Após o período de incubação, os espécimes foram removidos e lavados delicadamente duas vezes com PBS para a remoção de microrganismos não aderidos. Os espécimes foram retirados do poço da placa de cultura e colocados em tubos Falcon, contendo 500 µL de PBS. Em seguida estes tubos foram imersos em aparelho ultrassom (Ultrasonic, 1440 Plus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 20 minutos para separação do biofilme.

A partir dos 100 µL da suspensão bacteriana, foram realizadas diluições seriadas e plaqueadas em duplicatas em Agar sangue com hemina e mandiona para verificar crescimento bacteriano sendo as placas mantidas em anaerobiose de acordo com as condições fisiológicas para posterior contagem com auxílio do contador de colônias digital e transformação em UFC/mL. A contagem das colônias foi realizada por um pesquisador cego^{11,13,31,109}.

4.10 Análise da Morfologia Biofilme Aderido por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi realizada a avaliação da morfologia dos microrganismos aderidos sobre os espécimes¹⁰². Após o período de 72 horas após a adesão das células, os discos foram removidos cuidadosamente dos anéis foram imediatamente fixados em solução de glutaraldeído tamponado a 2,5% por 24 horas. Posteriormente à fixação inicial dos microrganismos, estes foram submetidos a fixação em glutaraldeído 2,5% (grau analítico) por 1 hora em temperatura ambiente ou por 24 horas a 4°C; 3 lavagens com PBS1x; e sofreram desidratação em soluções crescentes de etanol: Álcool 70% (1 hora); Álcool 90% (1 hora); Álcool absoluto (5 lavagens de 30 minutos cada)^{31,106}. Os discos ficaram em dessecador à vácuo com sílica por no mínimo 1 semana; foram metalizados em ouro e fixados nos stubs para análise da morfologia celular em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6610LV).

4.11 Análise Estatística

Os dados quantitativos foram analisados com software (Graph Pad Prism; GraphPad Software Inc.) As inferências estatísticas foram baseadas no nível de significância de 5%.

Os dados sobre a rugosidade superficial mostraram aderência a uma curva normal no D'Agostino, e um teste de normalidade de Pearson foi aplicado e complementado pelo teste T de amostras pareadas.

Para os ângulos de contato, os dados foram avaliados pelo teste T de amostras pareadas.

Para os dados de MTT e UFC/mL, foi aplicado ANOVA one-way, complementado pelo teste de Tukey.

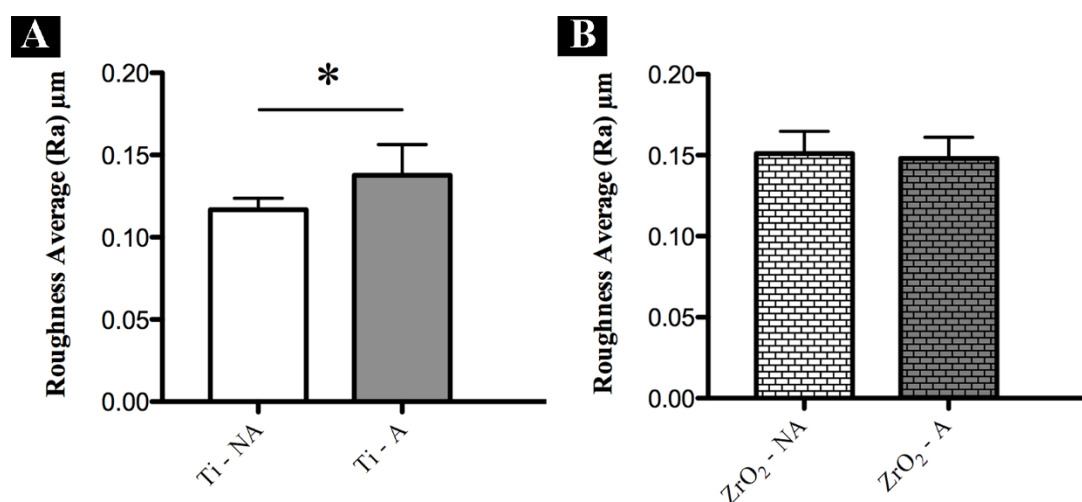
5 RESULTADO

Abaixo estão os resultados do estudo.

5.1 Análise das Superfícies

A rugosidade superficial dos discos de Ti e ZrO_2 foi padronizada entre 0,1 a 0,2 μm , ou seja, os discos nos quais a rugosidade estava com valor fora deste padrão foram excluídos do experimento. Os dados estão apresentados na figura 9.

Figura 9 - Efeito do envelhecimento na rugosidade da superfície de Ti e ZrO_2 .



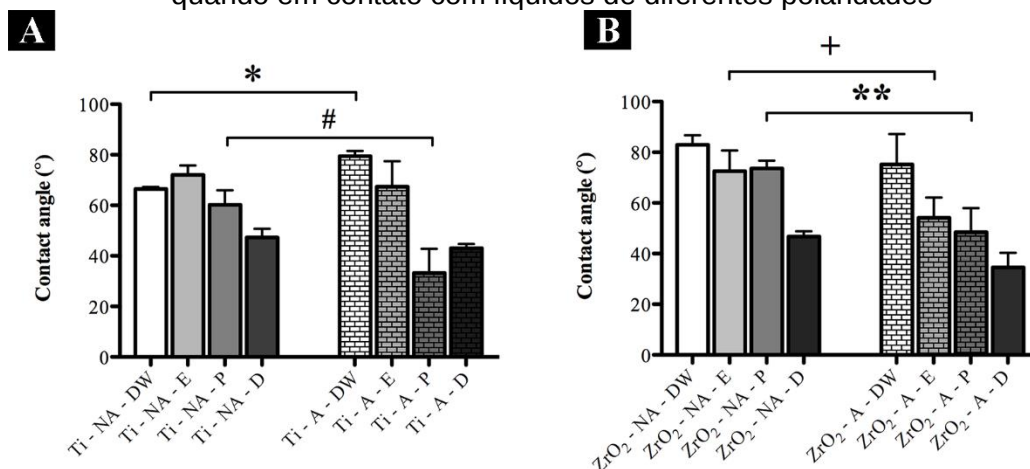
Ti = Titânio; ZrO_2 = Zircônia; NA = não envelhecido; A = envelhecido. A - Diferença estatisticamente significativa entre as medidas de rugosidade antes e depois do processo de envelhecimento. * $p=0.0033$. B - O processo de envelhecimento não afetou a rugosidade média dos discos de ZrO_2 .

Fonte: Elaboração própria.

Houve diferença significativa com aumento da rugosidade superficial após o envelhecimento para a superfície de Ti, enquanto que para a ZrO_2 não foi encontrada diferença após o processo de envelhecimento.

Os resultados dos ângulos de contato, após a estatística, estão apresentados na figura 10, nas quais mostram a média e o desvio padrão dos ângulos de contato dos líquidos: água destilada, diiodometano, polietilenoglicol e etilenoglicol para cada superfície analisada.

Figura 10 - Efeito do processo de envelhecimento na molhabilidade da superfície quando em contato com líquidos de diferentes polaridades



Ti = Titânio; ZrO₂ = Zircônia; NA = não envelhecido; A = envelhecido. A- O processo de envelhecimento afetou a molhabilidade da superfície de Ti quando em contato com água e polietilenoglicol. *p=0.0115; #p=0.0438 B- O processo de envelhecimento afetou a molhabilidade da superfície de ZrO₂ quando em contato com etilenoglicol e polietilenoglicol. *p=0.0002; **p=0.0352.

Fonte: Elaboração própria.

Observa-se que houve aumento significativo do ângulo de contato da água com a superfície de Ti após o processo de envelhecimento. Apesar de não haver diferença estatística nota-se que numericamente o valor do ângulo de contato da água após o envelhecimento sobre a ZrO₂ foi menor.

Já os ângulos de contato dos líquidos apolares, para a ZrO₂ após o envelhecimento observa-se que houve diminuição dos ângulos de etilenoglicol e polietilenoglicol. Enquanto que o ângulo para este último também diminuiu significativamente para o Ti

Os valores das médias dos ângulos de contato 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.

A tabela 1 mostra os valores de Energia Livre de Superfície para Ti e ZrO₂ antes e após o envelhecimento.

Tabela 1- Energia Livre de Superfície de Ti e ZrO₂ antes e após o envelhecimento

Energia Livre de Superfície	Antes do Envelhecimento	Após do Envelhecimento
Ti		
	35,57 mN/m	32,60 mN/m
ZrO₂	25,36 mN/m	34,86 mN/m

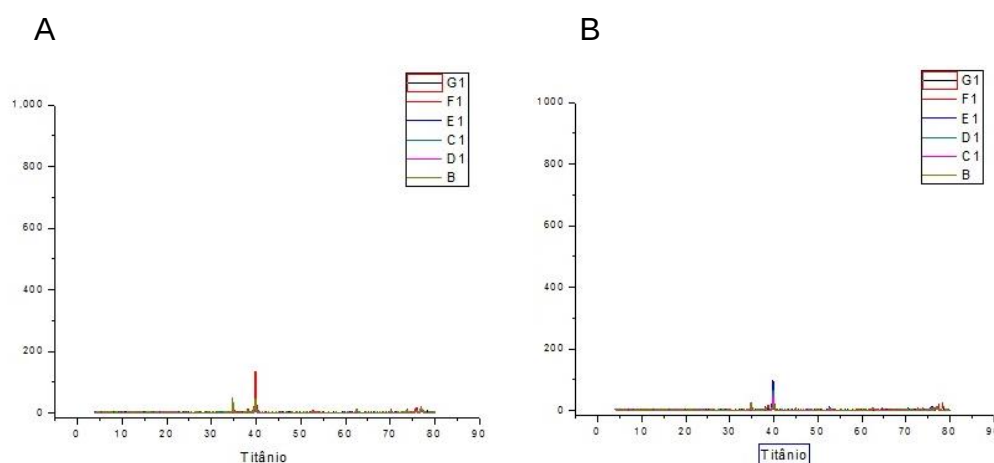
Ti = Titânio; ZrO₂ = Zircônia

Fonte: Elaboração própria.

Observa-se que numericamente o Ti praticamente manteve o valor de ELS, já para a ZrO₂, a ELS aumentou após o processo de envelhecimento.

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 é o valor desta energia.

Os resultados da análise de difração por raio x dos discos de Ti e ZrO₂ envelhecidos e não envelhecidos estão na figura 11 (A e B) e 12 (A e B) abaixo.

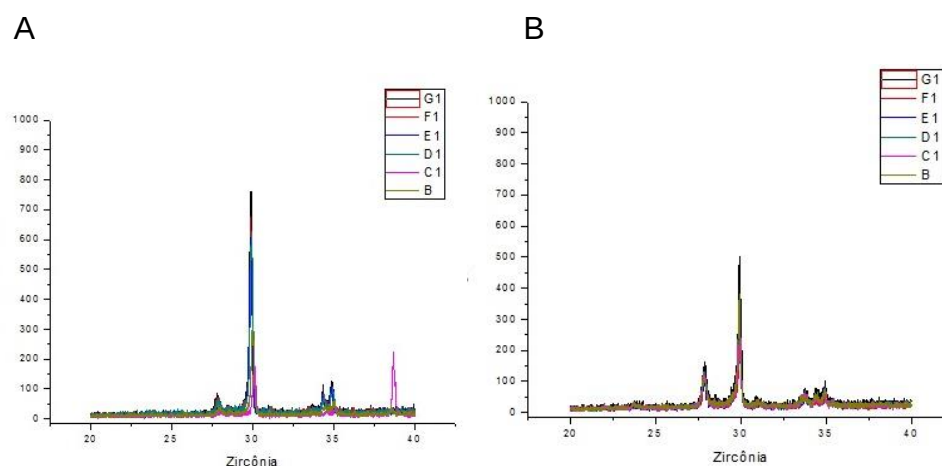
Figura 11. Efeito do processo de envelhecimento avaliado por difração por raio x dos discos de Ti antes e depois do envelhecimento

G1, F1, E1, D1, C1 e B representam as réplicas de amostras de Ti não envelhecidas e envelhecidas. A - Difração por raio x dos discos de Ti antes do envelhecimento: fase tetragonal no maior pico; B - Difração por raio x dos discos de Ti depois do envelhecimento. Não houve alteração para os discos de Ti.

Fonte: Elaboração própria.

Não foram observadas alterações na difração de raio x após o processo de envelhecimento para o Ti.

Figura 12 - Efeito do processo de envelhecimento avaliado por difração por raio x dos discos de ZrO_2 antes e depois do envelhecimento



G1, F1, E1, D1, C1 e B representam as réplicas de amostras de zircônia não envelhecidas e envelhecidas.

A - Difração por raio x dos discos de zircônia antes do envelhecimento: fase tetragonal no maior pico; B- Difração por raio x dos discos de zircônia depois do envelhecimento, diminuição da fase tetragonal, e aumento da fase monoclinica.

Fonte: Elaboração própria.

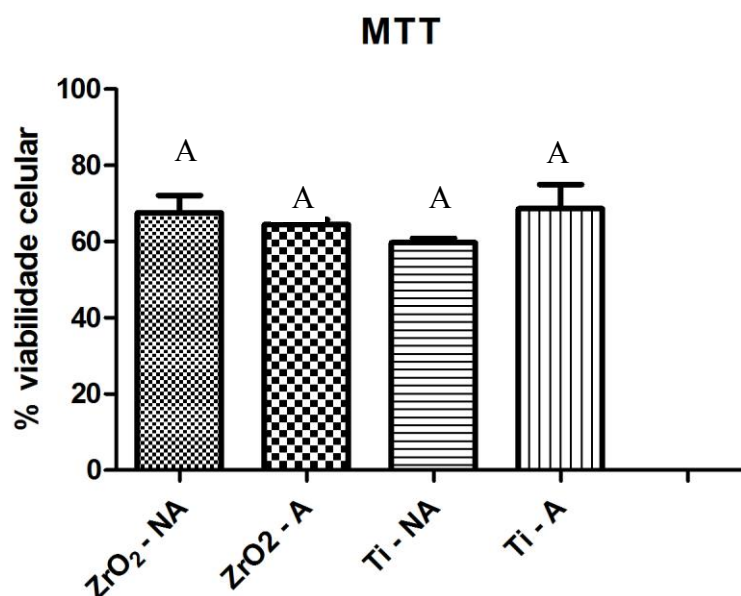
Observa-se que a ZrO_2 sofreu transformação de fase, com diminuição da fase tetragonal e aumento da monoclinica.

5.2 Avaliação da Viabilidade Celular (MTT) Nok-si

Após a aplicação do teste ANOVA a um critério fixo, foi observado que os fatores material e envelhecimento ($p > 0,05$) não apresentaram efeito sobre a viabilidade celular, assim como a interação entre eles (material*envelhecimento). Portanto, a viabilidade de queratinócitos orais normais (NOK-si) não foi afetada pelo tipo de material sobre o qual foram cultivadas. Da mesma forma, não houve alteração dessa viabilidade quando comparadas as superfícies envelhecidas.

Os dados de viabilidade celular estão apresentados representados graficamente na Figura 13.

Figura 13 - Viabilidade de queratinócitos orais normais (% de GCS-controle) após adesão em superfície não envelhecida e envelhecida de ZrO_2 e Ti comparado ao controle



Ti = Titânio; ZrO_2 = Zircônia; NA = não envelhecido; A = envelhecido.

Fonte: Elaboração própria.

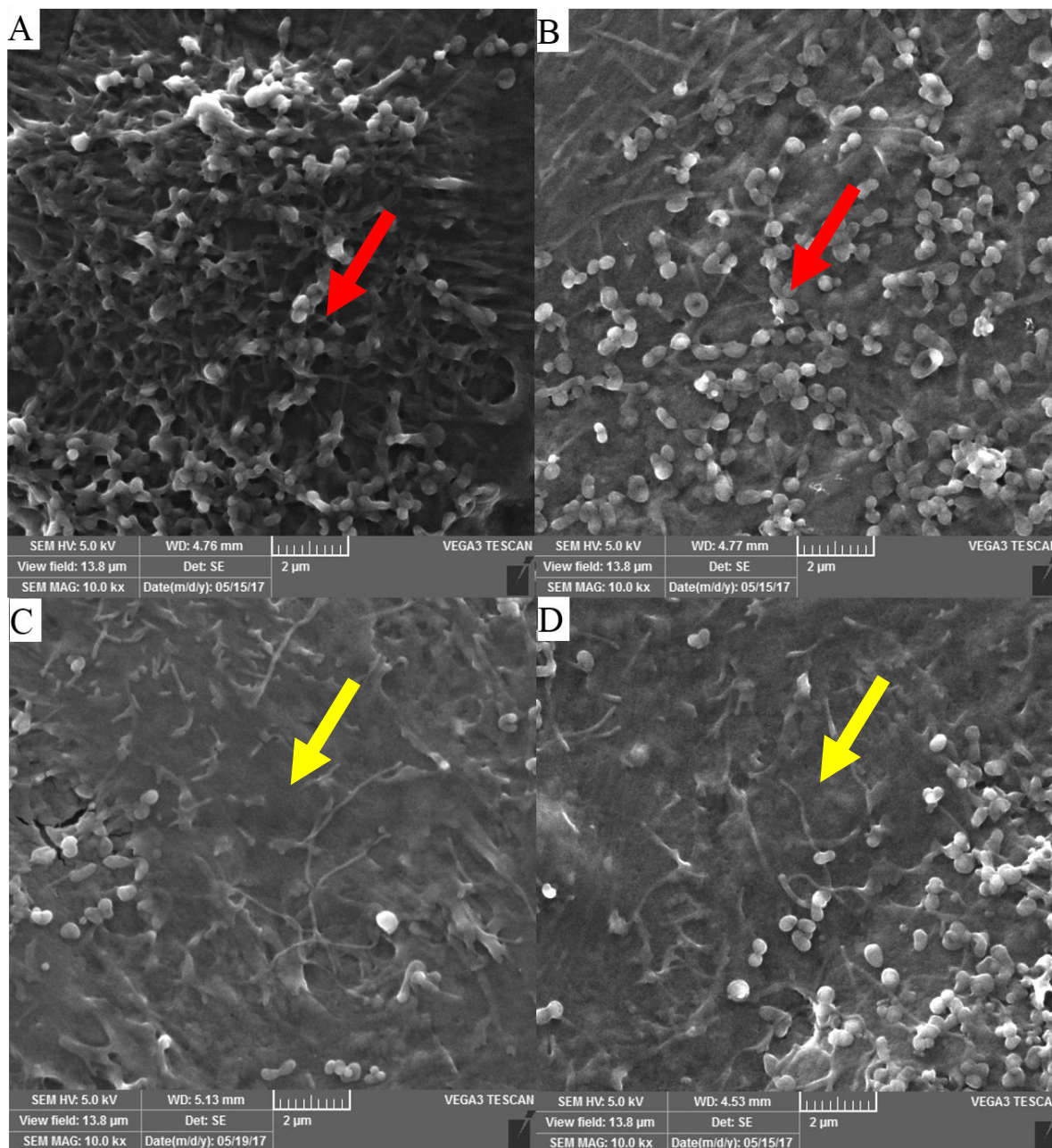
Para o teste MTT, não houve diferença estatística entre na adesão entre os diferentes tipos de materiais, Ti e ZrO_2 , envelhecidos ou não e em relação ao controle (LV).

No presente estudo não houve diferença na viabilidade e morfologia de queratinócitos orais normais (NOK-si) em relação ao tipo de material e envelhecimento das superfícies, entretanto, apesar de não haver diferença estatística para a viabilidade celular, a porcentagem de células viáveis no Ti foi maior para superfície envelhecida do que a não envelhecida e maior do que na zircônia.

5.3 Análise da Morfologia Celular (Nok-si) por MEV

A Figura 14 mostra a morfologia de queratinócitos orais normais Nok-si cultivados em ZrO_2 e Ti antes e após o envelhecimento. A densidade celular após de adesão, qualitativamente, se apresentou semelhante nos substratos de ZrO_2 e Ti, envelhecidos e não envelhecidos.

Figura 14 - Morfologia das células NOK-si após 24 horas de adesão aos diferentes substratos



A – ZrO_2 /não envelhecido; B - ZrO_2 / envelhecido; C - Ti/ não envelhecido; D – Ti/ envelhecido). MEV, ampliação original 10.000 x.

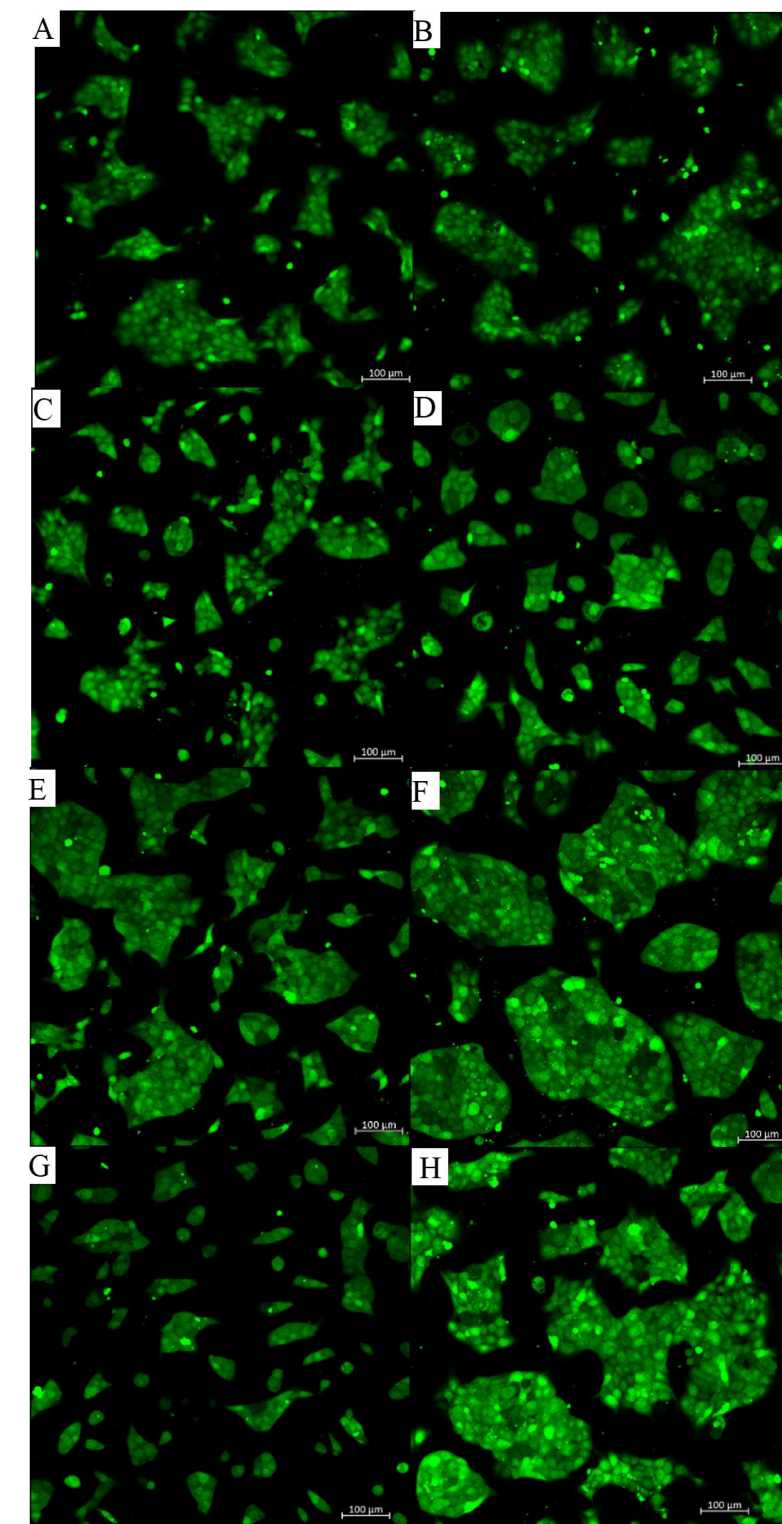
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A análise qualitativa da morfologia celular mostrou que as células ficaram mais espalhadas aderidas superfícies de Ti tanto não envelhecido quanto envelhecido (setas amarelas), já a ZrO_2 as células apresentam conformação arredondada com poucas projeções.

5.4 Análise de Proliferação Celular com CFSE

A Figura 15 mostra a proliferação das células NOK-si após 24 e 48 horas de adesão aos diferentes substratos ZrO_2 e Ti antes e após o envelhecimento.

Figura 15 - Proliferação das células NOK-si após 24 e 48 horas de adesão aos diferentes substratos



A – ZrO₂/ não envelhecido 24 horas; B - ZrO₂/ não envelhecido 48 horas; C - ZrO₂/ envelhecido 24 horas; D - ZrO₂/envelhecido 48 horas; E - Ti/ não envelhecido 24 horas; F- E - Ti/ não envelhecido 48 horas; G – Ti/envelhecido 24 horas, H – Ti/envelhecido 48 horas). Microscopia por Confocal, 10x.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

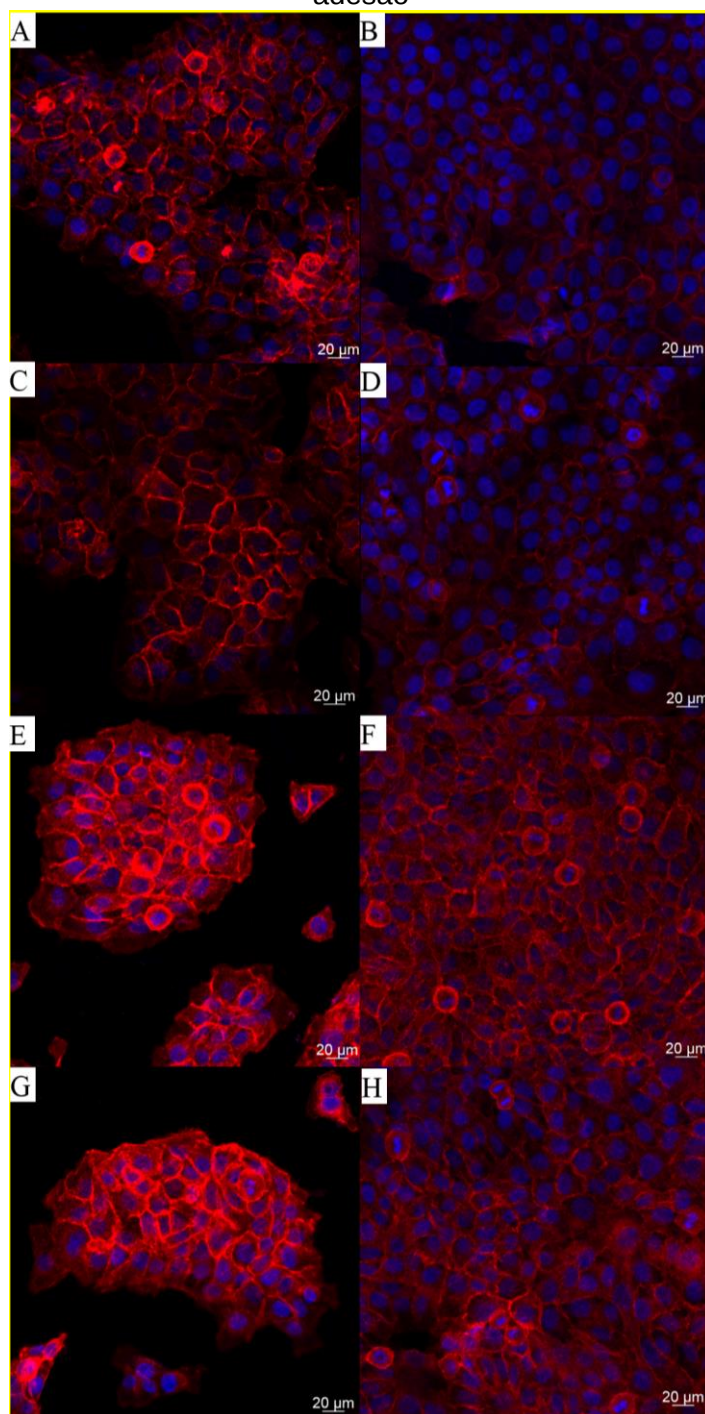
A análise qualitativa da proliferação celular da adesão de células epiteliais gengivais mostrou que o processo de envelhecimento favoreceu a proliferação celular para o Ti, quando comparamos a análises feitas em 24 e 48 horas. Já para a ZrO₂ o processo de envelhecimento não influenciou na proliferação celular.

Quando comparados os materiais, a ZrO₂ (envelhecida e não envelhecida) apresentou menor proliferação do que o Ti.

5.5 Análise da Adesão Celular (Nok-si) por Microscopia de Fluorescência

A Figura 16 mostra a adesão e a quantidade de β -actina presente nas células aderidas, às superfícies envelhecidas e não envelhecidas de Ti e ZrO₂.

Figura 16 - Adesão de células de Nok-si aos diferentes substratos em 24 e 48 horas após adesão



A - ZrO₂/não envelhecido, 24 horas; B - ZrO₂/não envelhecido, 48 horas; C - ZrO₂/envelhecido, 24 horas; D - ZrO₂/envelhecido, 48 horas; E - Ti/não envelhecido, 24 horas; F - Ti/não envelhecido, 48 horas; G - Ti/envelhecido, 24 horas; H - Ti/envelhecido, 48 horas). Microscopia por Confocal, 20 x.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A análise qualitativa mostrou que as células aderidas ao titânio, antes e após o envelhecimento, apresentaram uma maior quantidade de β -actina, o que sugere uma melhor manutenção da adesão para esta superfície, sugerindo que esta adesão tenha

melhor conservação a longo prazo. Já para a ZrO_2 , a quantidade de β -actina além de ser menor em 24 horas de adesão, diminuiu drasticamente em 48 horas, tanto para a superfície não envelhecida quanto para a envelhecida.

Na tabela 2 está demonstrada a Intensidade de β -actina analisada em valores brutos após aquisição das imagens apresentadas.

Tabela 2 – Intensidade de β -actina presente nas células aderidas, as superfícies envelhecidas e não envelhecidas de Ti e ZrO_2 observadas no teste de adesão

Medição de Fluorescência em 405 nm- 561 nm	24 hours	48 Hours
ZrO₂/Não envelhecido	22373.329	9742.792
ZrO₂/Envelhecido	18871.090	8352.457
Ti/ Não envelhecido	35589.327	19692.524
Ti/ Envelhecido	33707.224	20244.763

Ti = Titânio; ZrO_2 = Zircônia.

Fonte: Elaboração própria.

A análise quantitativa da análise de β -actina nas superfícies corroborou com o que foi observado nas imagens.

5.6 Quantificação do Biofilme por Contagem UFC/mL

A tabela 3 mostra os resultados em $\log_{10}$ UFC/mL a média e o desvio padrão

Tabela 3 - Efeito do envelhecimento na formação de biofilme às 72 horas através da mensuração quantitativa de UFC/mL em superfícies de Ti e ZrO₂ (não envelhecido e envelhecido) e controle

Grupo	Log ₁₀ UFC/mL	
	Média	DP
ZrO₂/Não envelhecido^a	6.95	0.09
ZrO₂/Envelhecido^c	7.23	0.07
Ti/ Não envelhecido^b	6.29	0.11
Ti/Envelhecido^b	6.40	0.12
C+^a	7.31	0.13

Ti = Titânio; ZrO₂ = Zircônia; C+= controle de poliestireno; DP= desvio padrão . Uma análise de variância unidirecional foi empregada com o teste post hoc de Tukey usando Graph-Pad Prism versão 5.0c. Os dados são mostrados como média ± DP. Diferenças estatisticamente significativas são indicadas como p <.05. Letras iguais representam resultados sem diferença significativa; letras diferentes representam resultados com uma diferença significativa

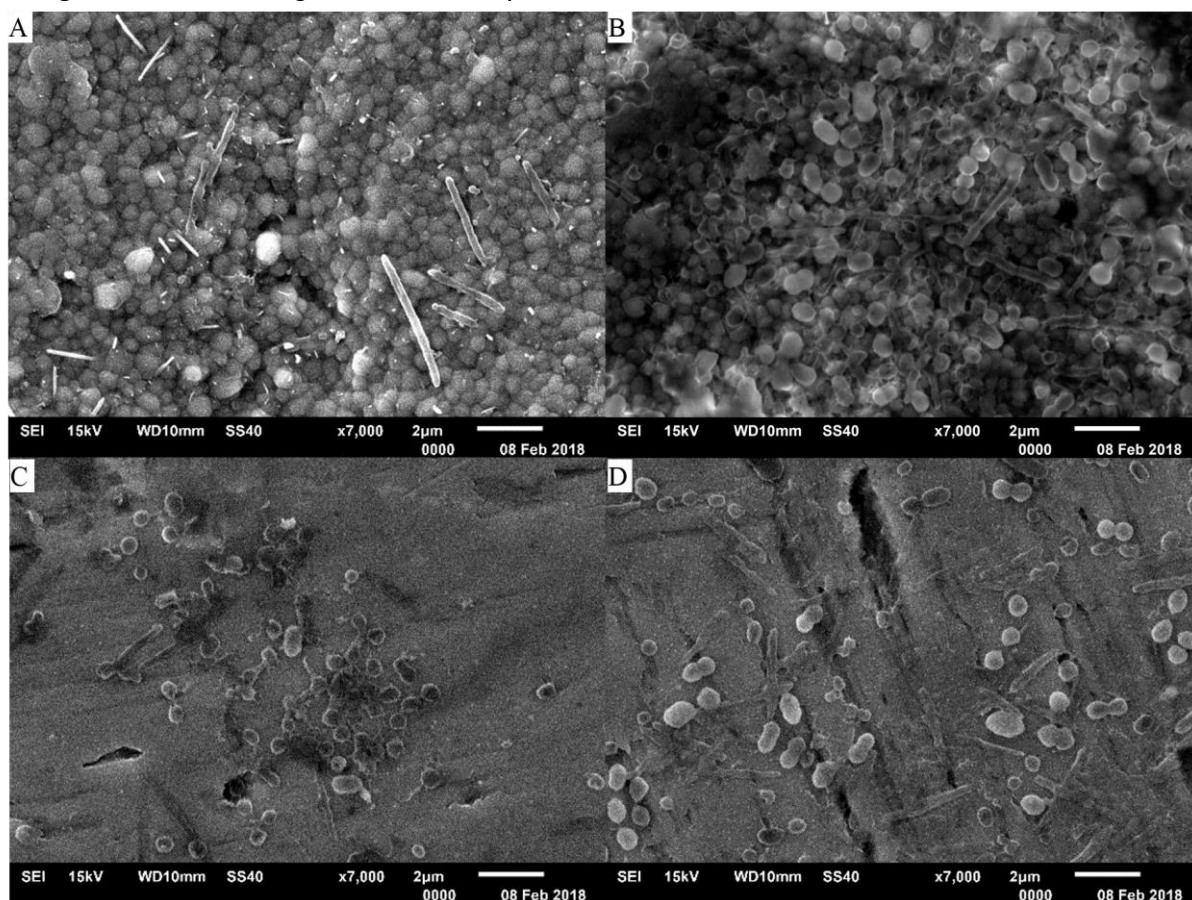
Fonte: Elaboração própria.

Quando se compara os materiais e o controle, o Ti apresentou significativamente menor adesão de biofilme do que a ZrO₂ e o controle. Após o envelhecimento, o Ti não apresentou alteração na adesão de microrganismos, já a ZrO₂, apresentou maior adesão na superfície envelhecida.

5.7 Análise da Morfologia Biofilme Aderido por MEV

A Figura 17 mostra a adesão do biofilme às superfícies envelhecidas e não envelhecidas de Ti e ZrO₂.

Figura 17 - Morfologia do biofilme após 72 horas de adesão com diferentes substratos



A –; ZrO₂/não envelhecido; B - ZrO₂/ envelhecido; C - T/ não envelhecido; D – T/ envelhecido). MEV, ampliação original 7000x.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A análise por MEV da formação de biofilme nas superfícies corroborou com o que foi observado na análise quantitativa.

6 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 profissionais¹⁷.

Para o tratamento com implantes, fatores devem ser avaliados, como a interação e adesão das células envolvidas, tanto na osseointegração (osteoblastos) quanto na barreira gengival (fibroblastos e células epiteliais), e a ausência do biofilme aderido. Assim, os materiais devem ser manufaturados, levando-se em conta a fabricação de superfícies, para que promovam as respostas esperadas dessas células^{76,103} e, assim, mantenham-se a longo prazo.

O presente estudo rejeitou parcialmente a hipótese nula, já que não foram observadas diferenças para as análises de viabilidade e MEV das células Nok-si.

Quanto a esterilização dos discos que não foram submetidos ao processo de envelhecimento, esta foi realizada por radiação gama dos discos. Em primeiro lugar os discos 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 Cloridrina¹¹⁰ (Souza, Graziano, 2010). Além de possuir mais desvantagens 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 microbiana¹¹⁰.

De acordo com Kim et al.⁶⁴ (2009), um método de simulação DBT usando autoclave de vapor exhibe uma transformação induzida por transformação (t-m) que pode induzir efeitos positivos ou negativos nas propriedades mecânicas de cerâmicas Y-TZP, dependendo da temperatura aplicada e da quantidade de m-fase resultante. Além disso, quando o envelhecimento ocorre após a superfície Y-TZP são detectadas diferentes quantidades de alterações finais de fase-m na superfície da cerâmica^{65,92}. A Degradação de Baixa Temperatura (DBT) foi simulada numa autoclave a 134 °C, sob 2 bar, durante um período de 20 h⁴⁰. No estudo de Chevalier et al.³⁷ (1999) foi observado que 20 h é tempo suficiente para promover uma extensa transformação t-m (aproximadamente 80%). Devido a essa significativa alteração e de ser indicativo

da avaliação do comportamento celular frente as superfícies de Ti e ZrO₂ envelhecida, este protocolo de envelhecimento acelerado foi escolhido.

A adesão e a proliferação de células podem variar dependendo da topografia da superfície, o que influencia os componentes no seu citoesqueleto⁷². O presente estudo rejeitou a hipótese nula, pois o envelhecimento influenciou a adesão de células e microrganismos em superfície de ZrO₂.

Uma das propriedades que interfere na adesão celular é a rugosidade de superfície. No presente estudo houve a padronização inicial da rugosidade de todas as amostras entre 0,1 µm a 0,2 µm antes do envelhecimento. No caso de *abutments* de implantes, o valor de rugosidade com um valor inferior a 0,2 µm 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 mole², pois representa um valor abaixo do qual pode ser observada produção de resposta celular⁷⁰.

Quando exposto ao ar, o Ti e suas ligas formam espontaneamente uma película contínua. A formação desta película ocorre em um tempo extremamente curto, em torno de 30 ms após acabamento, a superfície do Ti CP é coberta por uma camada fina de óxido de Ti composta comumente por TiO₂ com espessura variando entre 1 a 20 nm. A camada de óxidos é, muitas vezes, denominada de filme passivo, pois possui uma estrutura estável e compacta, o que indica a sua alta resistência à corrosão em solução fisiológica. Tanto a espessura quanto a composição química da camada de óxidos do titânio exibem importante papel na adsorção de proteínas provenientes dos fluidos biológicos. O aumento da rugosidade do Ti após o envelhecimento deve-se provavelmente a formação dessa camada de óxido de Ti. A alta biocompatibilidade do Ti CP é atribuída ao filme passivo em sua superfície, proporcionando uma interação com moléculas proteicas¹¹¹.

Apesar do valor da rugosidade para os dois materiais ter permanecido abaixo de 0,2 µm, houve diferença significativa para a rugosidade superficial após o envelhecimento do Ti, o que influenciou maior adesão e proliferação celular, além de maior quantidade de β-actina, já para adesão bacteriana foi menor no Ti.

Nos achados de Kimura et al.¹¹², em 2012, os valores de rugosidade de ambos os tipos de discos foram semelhantes, sugerindo que seu efeito sobre a ligação celular seria equivalente, e corrobora com Muñoz et al.¹¹³ (2017), no qual a rugosidade da ZrO₂ permaneceu sem alterações significativas após envelhecimento em autoclave,

porém discorda do estudo de Forster et al.¹⁰³, em 2014, pois a rugosidade da ZrO₂ aumentou. Segundo Quirynen et al.⁷⁰ (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.

Na revisão de Teng et al.⁵² (2012), os autores observaram que muitos estudos relatavam a "sobrevivência" dos *abutments*/pilares de Ti e ZrO₂, que foi definida como a sua permanência in situ para o período de observação com ou sem modificações que o tempo médio de seguimento dos *abutments* cerâmicos foi de 3,7 anos e o tempo médio de seguimento dos *abutments* metálicos foi de 4,8 anos. Após um período de observação médio estimado de 5 anos, podem ser esperadas altas taxas de sobrevivência para pilares cerâmicos (99,1%) e metálicos (97,4%). Nenhuma diferença no desempenho técnico e biológico dos pilares de cerâmica e metal poderia ser demonstrada nesta revisão. No presente estudo não houve diferença na viabilidade e morfologia de queratinócitos orais normais (NOK-si) em relação ao tipo de material e envelhecimento das superfícies, entretanto, apesar de não haver diferença estatística para a viabilidade celular, a porcentagem de células viáveis no Ti foi maior para superfície envelhecida do que a não envelhecida e maior do que na ZrO₂.

Nossos resultados demonstraram que após o envelhecimento, a superfície de ZrO₂ sofreu alterações em relação ao molhamento dos líquidos etilenoglicol e polietilenoglicol, com o maior valor de tensão superficial¹⁵, além da transformação de fase, com diminuição da fase tetragonal e aumento da monoclinica¹¹⁴; e enquanto o Ti, tornou-se mais hidrofóbico e manteve-se lipofílico, sem alterações observadas na análise de difração. Os líquidos polietilenoglicol e etilenoglicol, apresentam menor polaridade e, uma vez que os ângulos de contato entre o agente e a superfície do Ti apresentaram valores inferiores a 50°, assim maior molhabilidade e interação da superfície com esses líquidos, pode-se concluir que os materiais admitem características lipofílicas¹¹⁵, este mesmo comportamento foi observado anteriormente⁷⁶.

Para a água, os ângulos de contato foram maiores para ZrO₂ e Ti, caracterizando a superfície como hidrofóbica. As moléculas ao interagir com essas superfícies tendem a repelir-se. Após o envelhecimento, o ângulo de contato da água com o Ti aumentou, diminuindo a interação da superfície com a água destilada, uma vez que a ZrO₂ foi ligeiramente menos hidrofóbica após o envelhecimento. O Ti

praticamente manteve o valor de ELS como consequência de maiores forças de interação intermolecular na superfície. No entanto, a ELS de ZrO_2 aumentou após o envelhecimento³⁵. A ELS representa a tensão superficial de cada material, e quanto maior a 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.

Da mesma forma que os líquidos, as células apresentam diferentes polaridades conferidas de acordo com a composição química da membrana plasmática⁶⁶, e desta forma interagem com as superfícies de acordo com a natureza química. As células apresentaram maior adesão e proliferação ao Ti ¹⁰³, e isso pode ser confirmado pelo fato de que o tipo de células possui atração preferencialmente pelos materiais hidrofóbicos e lipofílicos, sugerindo que a interação final entre elementos químicos da membrana das células epiteliais criou um ambiente com essa natureza^{66,76}.

Para a viabilidade e morfologia celular, não foram encontradas diferenças em ambos os materiais, antes e depois do envelhecimento, o que pode ser explicado pelo fato de as células aderem a uma camada intermediária de moléculas de matriz extracelular depositada⁸. Por outro lado, as células aderidas ao Ti , antes e após o envelhecimento, mostraram uma maior quantidade de β -actina, o que sugere uma melhor manutenção da adesão para esta superfície, sugerindo que esta adesão tenha melhor conservação a longo prazo. Já para a ZrO_2 , a quantidade de β -actina além de ser menor em 24 horas de adesão, diminuiu drasticamente em 48 horas, tanto para a superfície não envelhecida quanto para a envelhecida. As proteínas adsorvidas pelo substrato, segundo alguns autores, são influenciadas pela molhabilidade da superfície, influenciando o estado conformacional destas proteínas^{8,116,117}. 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^{8,116,117}.

A análise da proliferação celular mostrou um maior número de células aderidas as superfícies de Ti , que possui característica hidrofóbica e lipofílica, 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^{8,17,79}. No estudo de Forster et al.¹⁰³ (2014) a ZrO₂ apresentou menor proliferação celular, corroborando com os achados no presente estudo.

Nakamura et al.²⁴, em 2010, mostraram, por meio de uma revisão sistemática, que as dimensões dos tecidos moles peri-implantares ao redor do *abutment* de ZrO₂ foram similares as de Ti. Em outra revisão sistemática, Linkevicius, Apse²⁶, em 2008, os autores analisaram a estabilidade de materiais de *abutments* de implantes em relação aos tecidos peri-implantares e observaram semelhança nos resultados entre o Ti e a ZrO₂ em contato com tecidos moles e duros.

A formação de biofilme por bactérias em material oral é influenciada por muitos fatores. Bactérias expressam uma grande variedade de moléculas complexas que podem contribuir para as tendências gerais de microrganismos que interagem com outras células e podem criar energia final^{15,78}. Como a interação entre microrganismos é fundamental para a colonização inicial e subsequente formação de biofilme em superfícies dentárias, a limitação de modelos de biofilme in vitro descritos na literatura até o momento pode explicar os resultados inconsistentes¹⁵.

Estudos de colonização bacteriana ao redor de *abutments* de Ti e ZrO₂ mostraram resultados conflitantes^{42,43}. Alguns estudos não mostram diferenças na colonização bacteriana em torno dessas superfícies de *abutment*^{43,59,118,119} enquanto outros mostram que as superfícies de ZrO₂ exibem menor colonização^{10,30,120-122}. Entretanto no presente estudo, observou-se maior adesão de biofilme na ZrO₂ tanto envelhecida como não envelhecida do que no Ti. Esses dados corroboram com os achados de Rimondini et al.¹⁰⁸, 2001; Al-Ahmad et al.⁸², 2013, Smith, Turkyilmaz,¹⁰⁷ 2014; Avila et al.¹⁵, 2017.

No estudo de Pier-Francisco a adesão de *P. gingivalis* ao Ti foi inibida em níveis de rugosidade superficial abaixo daqueles geralmente encontrados para *abutments*/pilares de implante (Ra 350 nm). Portanto, é clinicamente relevante saber como as bactérias se comportam em diferentes tipos de superfícies, a fim de desenvolver novos materiais e/ou novos tipos de superfícies de tratamento, que reduzam ou inibam a adesão de microrganismos patogênicos e, assim, restrinjam o uso de *abutments* com indicação de propensão para adesão bacteriana³.

A adesão de células e de microrganismos são provavelmente o resultado de diferenças na composição química, rugosidade superficial e ELS¹⁵. A correlação positiva entre ELS e adesão celular e bacteriana dependeu da natureza química similar de ambas as superfícies e células^{15,98}. O envelhecimento de Ti e ZrO₂ não

afetou a viabilidade e a morfologia celular. Porém para a ZrO_2 o efeito do envelhecimento levou a menor proliferação e adesão de células, e maior adesão biofilme, sendo assim, antes e após o envelhecimento o Ti mostrou-se melhor quando comparado à ZrO_2 , para formação de barreira tecidual e manutenção da saúde do tecido peri-implantar.

A ELS é uma propriedade importante que interfere na qualidade do tecido mole e na adesão de microrganismos ao redor dos implantes dentários^{15,76,98}. Esses dados podem ser considerados para o desenvolvimento de novas superfícies de materiais, que proporcionem a manutenção da barreira celular e desfavoreçam a adesão de microrganismos, apesar do tempo decorrido desde a instalação do material na boca.

Dada à relevância clínica, apesar das limitações experimentais intrínsecas do estudo in vitro, experimento com apenas um único tipo de células e uso de bactérias periodontais específicas e selecionadas, mais estudos são necessários para avaliar tanto o comportamento das células sobre superfícies utilizadas como *abutments*, quanto à qualidade deste contato com as mesmas superfícies, devido inclusive a constatare renovação celular. Ao mesmo tempo, entender como a superfície influencia a manutenção do tecido peri-implantar desde sua instalação e no decorrer do tempo, o que dará suporte à indicação de *abutment* adequado para cada caso, especialmente em pacientes com comprometimento periodontal e que promova uma melhora na taxa de sobrevida e sucesso dos implantes ao longo do tempo.

7 CONCLUSÃO

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

Observamos também que:

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

REFERÊNCIAS*

1. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol* 2000. 2002; 30: 70–8.
2. Mustafa K, Wennerberg A, Arvidson K, Messelt EB, Haag P, Karlsson S. Influence of modifying and veneering the surface of ceramic abutments on cellular attachment and proliferation. *Clin Oral Impl Res*. 2008; 19(11): 1178-87
3. Avila ED, de Molon RS, Vergani CE. The relationship between biofilm and physical-chemical properties of implant abutment materials for successful dental implants. *Materials (Basel)*. 2014; 7(5): 3651-62.
4. Apratim A, Eachempati P, Salian KK, Singh V, Chhabra S, Shah S. Zirconia in dental implantology: a review. *J Int Soc Preventive Community Dent*. 2015; 5(3): 147-156.
5. Jokstad A, Braegger U, Brunski JB, Carr AB, Naert I, Wennerberg A. Quality of dental implants. *Int Dent J*. 2003; 53(6 Suppl 2): 409-43.
6. Maló P, de Araújo Nobre M, Lopes A, Ferro A, Gravito I. Single-tooth rehabilitations supported by dental implants used in an immediate-provisionalization protocol: report on long-term outcome with retrospective follow-Up. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015; 17(Suppl 2): e511-9.
7. Glauser R, Sailer I, Wohlwend A, Studer S, Schibli M, Scharer P. Experimental zirconia abutments for implant-supported single-tooth restorations in esthetically demanding regions: 4-year results of a prospective clinical study. *Int J Prosthodont*. 2004; 17(3): 285–90.
8. Jansen JA, Den Braber ET, Walboomers XF, De Ruijter JE. Soft Tissue and Epithelial Models. *Adv Dent Res*. 1999; 13: 57-66.
9. Baharloo B, Textor M, Brunette DM. Substratum roughness alters the growth, area, and focal adhesions of epithelial cells, and their proximity to titanium surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2005; 74(1): 12–22.
10. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol*. 2004; 75: 292–6.
11. Pier-Francesco A, Adams RJ, Waters MG, Williams DW. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17(6): 633-7.

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

12. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW, et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008; 23(2): 327–34.
13. Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin. Oral Impl. Res*. 2009; 21: 156–64.
14. Dorkhan M, Paz LEC, Marie Skepö M, Svensäter G, Davies JR. Effects of saliva or serum coating on adherence of *Streptococcus oralis* strains to titanium. *Microbiology*. 2012; 158(Pt 2), 390–97.
15. Avila ED, Vergani CE, Junior FAM, Junior MJ, Shi W, Lux R. Effect of titanium and zirconia dental implant abutments on a cultivable polymicrobial saliva community. *J Prosthet Dent*. 2017; 118(4): 481-7.
16. Glauser R, Peter Schupbach P, Gottlow J, Hammerle CHF. Periimplant soft tissue barrier at experimental one-piece mini-implants with different surface topography in humans: a light-microscopic overview and histometric analysis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2005; 7(1): 44-51.
17. Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AEF, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Impl Res*. 2006; 17 (Suppl. 2): 55–67.
18. Stern IB. Current concepts of the dentogingival junction: the epithelial and connective tissue attachments to the tooth. *J Periodontol*. 1981; 52(9): 465–76.
19. Damek-Poprawa M, Korostoff J, Gill R, DiRienzo JM. Cell junction remodeling in gingival tissue exposed to a microbial toxin. *J Dent Res*. 2013; 92(6): 518-23.
20. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res*. 1991; 2(2): 81–90.
21. Buser D, Weber HP, Donath K, Fiorellini JP, Paquette DW, Williams RC. Soft tissue reactions to non-submerged unloaded titanium implants in beagle dogs. *J Periodontol*. 1992; 63(3): 225–35.
22. Hermann JS, Buser D, Schenk RK, Schoolfield JD, Cochran DL. Biologic Width around one- and two-piece titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12(6): 559–71.
23. Yildirim M, Edelhoff D, Hanisch O, Spiekermann H. Ceramic abutments-a new era in achieving optimal esthetics in implant dentistry. *Int J eriodontics Restorative Dent*. 2000; 20(1): 81-91.
24. Nakamura K, Kanno T, Milleding P, Örtengren U. Zirconia as a dental Implant abutment material: a systematic review. *Int J Prosthodont*. 2010; 23: 299–309.
25. Steinemann SG. Titanium – the material of choice? *Peridontol*. 1998; 17: 7-21.

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

40. Pereira GKR, Amaral M, Cesar PF, Bottino MC, Kleverlaan CJ, Valandro LF. Effect of low-temperature aging on the mechanical behavior of ground Y-TZP. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015; 45: 183-192.
41. Rekow D, Thompson VP. Engineering long term clinical success of advanced ceramic prostheses. *J Mater Sci Mater Med.* 2007; 18(1): 47-56.
42. Sailer I, Zembic A, Jung RE, Siegenthaler D, Holderegger C, Hämmerle CHF. Randomized controlled clinical trial of customized zirconia and titanium implant abutments for canine and posterior single-tooth implant reconstructions: preliminary results at 1 year of function. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20: 219-25.
43. Zembic A, Bösch A, Jung RE, Hämmerle CHF, Sailer I. Five-year results of a randomized controlled clinical trial comparing zirconia and titanium abutments supporting single-implant crowns in canine and posterior regions. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24: 384-90.
44. Kumar Y, Jain V, Chauhan SS, Bharate V, Koli D, Kumar M. Influence of different forms and materials (zirconia or titanium) of abutments in peri-implant soft-tissue healing using matrix metalloproteinase-8: A randomized pilot study. *J Prosthet Dent* 2017; 118: 475-480.
45. Abrahamsson I, Berglundh T, Glantz PO, Lindhe J. The mucosal attachment at different abutments: an experimental study in dogs. [J Clin Periodontol.](#) 1998; 25(9): 721–7.
46. Berglundh T, Lindhe J, Jonsson K, Ericsson I. The topography of the vascular systems in the periodontal and peri-implant tissues in the dog. *J Clin Periodontol.* 1994; 21(3):189-93.
47. James RA, Schultz RL. Hemidesmosomes and the adhesion of junctional epithelial cells to metal implants—a preliminary report. *Oral Implantol.* 1974; 4(3): 294–302.
48. Gould TR, Westbury L, Brunette DM. Ultrastructural study of the attachment of human gingiva to titanium in vivo. *J Prosthet Dent.* 1984; 52(3): 418–20.
49. McKinney RVJr, Steflik DE, Koth DL. Evidence for a junctional epithelial attachment to ceramic dental implants. A transmission electron microscopic study. *J Periodontol.* 1985; 56(10): 579–91.
50. Kawahara H, Kawahara D, Mimura Y, Takashima Y, Ong JL. Morphologic studies on the biologic seal of titanium dental implants. Report II. In vivo study on the defending mechanism of epithelial adhesion/ attachment against invasive factors. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998; 13: 465–73.
51. Swope EM, James RA. A longitudinal study on hemidesmosome formation at the dental implant-tissue overflow. *J Oral Implantol.* 1981; 9: 412–22.

52. Teng F, Ko C, Kuo H, Hu J, Lin J, Lou C, et al. A comparison of epithelial cells, fibroblasts, and osteoblasts in dental implant titanium topographies. *Bioinorg Chem Appl.* 2012; 1-9.
53. Grössner-Schreiber B, Teichmann J, Hannig M, Dörfer C, Wenderoth DF, Ott SJ. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clin Oral Impl Res.* 2009; 20: 817–26.
54. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 1998; 17: 63-76.
55. Razatos A, Ong YL, Sharma MM, Georgiou G. Evaluating the interaction of bacteria with biomaterials using atomic force microscopy. *J. Biomater.Sci. Polym.* 1998; 9: 1361-73.
56. Drake DR, Paul J, Keller, J.C. Primary bacterial colonization of implants surfaces. *Inter J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14: 226-232.
57. Mabboux F, Ponsonnet L, Morrier JJ, Jaffrezic N, Barsotti O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials--an in vitro study. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2004; 39(4): 199-205.
58. Taira M, Kagiya T, Harada H, Sasaki M, Kimura S, Narushima T, et al. Microscopic observations and inflammatory cytokine productions of human macrophage phagocytising submicron titanium particles. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21: 267-75.
59. van Brakel R, Cune MS, van Winkelhoff AJ, de Putter C, Verhoeven JW, van der Reijden W. Early bacterial colonization and soft tissue health around zirconia and titanium abutments: an in vivo study in man. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22: 571-7.
60. Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater.* 2008; 24: 299–307.
61. Lucas TJ, Lawson NC, Janowski GM, Burgess JO. Phase transformation of dental zirconia following artificial aging. *Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 00B. 2014; 1-5.
62. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials.* 1999; 20(1): 1-25.
63. Kim JW, Covell NS, Guess PC, Rekow ED, Zhang Y. Concerns of hydrothermal degradation in CAD/CAM zirconia. *J Dent Res.* 2010; 89(1): 91-5.
64. Kim HT, Han JS, Yang JH, Lee JB, Kim SH. The effect of low temperature aging on the mechanical property & phase stability of Y-TZP ceramics. *J Adv Prosthodont.* 2009; 1(3): 113-7.
65. Kobayashi K, Kuwajima H, Masaki, T. Phase change and mechanical properties of $\text{ZrO}_2\text{--Y}_2\text{O}_3$ solid electrolyte after ageing. *Solid State Ion.* 1981; 3(4): 489–95.

66. Rodriguez-Boulan E, Macara IG. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(4): 225-42.
67. Deville S, Chevalier J, Gremillard L. Influence of surface finish and residual stresses on the ageing sensitivity of biomedical grade zirconia. *Biomaterials.* 2006; 27(10): 2186-92.
68. Chevalier J, Loh J, Gremillard L, Meille S, Adolfson E. Low-temperature degradation in zirconia with a porous surface. *Acta Biomater.* 2011; 7: 2986-93.
69. Sanon C, Chevalier J, Douillard T, Cattani-Lorente M, Scherrer SS, Gremillard L. A new testing protocol for zirconia dental implants. *Dent Mater.* 2015; 31(1): 15-25.
70. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation an in vivo study in man. *J Clin Periodontol.* 1990; 17: 138–44.
71. Kloss FR, Steinmüller-Neth D, Stigler RG, Ennemoser T, Rasse M, Hächl O. In vivo investigation on connective tissue healing to polished surfaces with different surface wettability. *Clin Oral Impl Res.* 2011; 22: 699–705.
72. Hormia M, Kononen M, Kivilathi J, Virtanen I. Immunolocalization of proteins specific for adherens junctions in human gingival epithelial cells grown on differently processed titanium surfaces. *J Periodontol Res.* 1991; 26: 491–7.
73. Di Carmine M, Toto P, Feliciani C, Scarano A, Tulli A, Strocchi R, Piattelli A. Spreading of epithelial cells on machined and sandblasted titanium surfaces: an in vitro study. *J Periodontol.* 2003; 74: 289–95.
74. Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials.* 1997; 18: 1573-83.
75. Roach P, Farrar D, Perry CC. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *J Am Chem Soc.* 2005; 127: 8168-73.
76. Rigolin MSM, de Avila ED, Basso FG, Hebling J, de S Costa CA, Mollo Junior FA. Effect of different implant abutment surfaces on OBA-09 epithelial cell adhesion. *Microsc Res Tech.* 2017;80(12): 1304-1309.
77. Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater.* 2004; 7(8):37-57.
78. Popovici J, White CP, Hoellec J, Kinklea BK, Lytle DA. Characterization of the cell surface properties of drinking water pathogens by microbial adhesion to hydrocarbon and electrophoretic mobility measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2014; 118:126–32.
79. Colvin RB. Fibrinogen–fibrin interactions with fibroblasts and macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408: 621–33.

80. Tzoneva R, Fauchaux N, Groth T. Wettability of substrata controls cell-substrate and cell-cell adhesions. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1770(11): 1538-47.
81. Gittens RA, Mclachlan T, Olivares-Navarrete R. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*. 2011; 32: 3395-403.
82. Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Fackler A, Follo M, Hellwig E, Bächle M, Hannig C, Han JS, Wolkewitz M, Kohal R. In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(9): 1139-47.
83. Chevalier J, Gremillard L, Deville S. Low-Temperature Degradation of Zirconia and Implications for Biomedical Implants. *Annu Rev Mater Res*. 2007; 37(1): 1–32.
84. Basílio AM, Cardoso VK, Antonio GS, Rizkalla SA, Santos JCG, Arioli FNJ. Effects of artificial aging conditions on yttria-stabilized zirconia implant abutments. *J Prosthet Dent*. 2016; 1-9.
85. Flinn BD, deGroot DA, Mancl LA, Raigrodski AJ. Accelerated aging characteristics of three yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystalline dental materials. *J Prosthet Dent* 2012; 108:223-30.
86. Lughì V, Sergo V. Low temperature degradation -aging- of zirconia: A critical review of the relevant aspects in dentistry. *Dent Mater*. 2010; 26(8): 807-20.
87. Lee JK, Kim H. Surface crack initiation in 2Y-TZP ceramics by low temperature aging. *Ceram Int*. 1994; 20: 413–8.
88. Lance MJ, Vogel EM, Reith LA, Cannon RW. Low-temperature aging of zirconia ferrules for optical connectors. *J Am Ceram Soc*. 2001; 84: 2731–3.
89. Li J-F, Watanabe R, Zhang B-P, Asami K, Hashimoto K. X-ray Photoelectron Spectroscopy Investigation on the Low-Temperature Degradation of 2 mol% Y₂O₃-ZrO₂ Ceramics. *J Am Ceram Soc*. 1996; 79(12): 3109–12.
90. Luo H, Tang X, Dong Z, Tang H, Nakamura T, Yatani H. The influences of accelerated aging on mechanical properties of veneering ceramics used for zirconia restorations. *Dent Mater J*. 2016; 35(2): 187-93.
91. International Organization for Standardization. ISO 14801:2007. Dentistry -- Implants -- Dynamic fatigue test for endosseous dental implants.
92. Lee TH, Lee SH, Her SB, Chang WG, Lim BS. Effects of surface treatments on the susceptibilities of low temperature degradation by autoclaving in zirconia. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012; 100(5): 1334-43.
93. International Organization for Standardization. ISO 11137:2006. Sterilization of health care products — Radiation — Part 2: Requirements for development, validation, and routine control of a sterilization process for medical devices.

94. Park JH, Olivares-Navarrete R, Baier RE, Meyer AE, Tannenbaum R, Boyan BD, Schwartz Z. Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. *Acta Biomaterialia*. 2012; 8(5): 1966–75.
95. Takamori ER, Cruz R, Fábio Gonçalves F, Zanetti RV, Artemio Zanetti A, Granjeiro JM. Effect of roughness of zirconia and titanium on fibroblast adhesion. *Artificial Organs*. 2008; 32: 305–9.
96. Cotes C, Arata A, Melo RM, Bottino MA, Machado JB, Souza ROA. Effects of aging procedures on the topographic surface, structural stability, and mechanical strength of a ZrO₂-based dental ceramic. *Dental Materials*. 2014; 30: 396–404.
97. Janssen D, De Palma R, Verlaak S, Heremans P, Dehaen W. Static solvent contact angle measurements, surface free energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicon dioxide. *Thin Solid Films*. 2006; 515: 1433–8.
98. Al-Radha ASD, Dymock D, Younes C, O'Sullivan D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J Dent*. 2012; 40: 146 – 53.
99. Castilho RM, Squarize CH, Leelahavanichkul K, Zheng Y, Bugge T, Gutkind JS. Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. *PLoS One*. 2010 ;5(5): e10503.
100. Groeger SE, Meyle J. Epithelial barrier and oral bacterial infection *Periodontology 2000*. 2015; 69:46–67.
101. Groessner-Schreiber B, Neubert A, Muller WD, Hopp M, Griepentrog M, Lange KP. Fibroblast growth on surface-modified dental implants: an in vitro study. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 64(4): 591–9.
102. Räisänen L, Kononen M, Juhanoja J, Varpavaara P, Hautaniemi J, Kivilahti J, et al. Expression of cell adhesion complexes in epithelial cells seeded on biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2000; 49: 79–87.
103. Forster A, Ungvári K, Györgyey A, Kukovecz A, Turz K, Nagy K. Human epithelial tissue culture study on restorative materials. *Journal of dentistry*. 2014; 42:7–14.
104. Nagayama M, Sato M, Yamaguchi R, Tokuda C, Takeuchi H. Evaluation of co-aggregation among *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Lett Appl Microbio*. 2001; 33: 122-5.
105. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res*. 2011; 46(2): 252-60.
106. Sánchez MC, Fernández E, Llama-Palacios A, Figuero E, Herrera D, Sanz M. Response to antiseptic agents of periodontal pathogens in in vitro biofilms on titanium and zirconium surfaces. *Dent Mater*. 2017; 33(4): 446-453.

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

120. Nascimento C, Pita MS, Santos E de S, Monesi N, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, et al. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. *Dent Mater.* 2016; 32: 93-101.
121. Nascimento CD, Pita MS, Fernandes FHNC, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25: 337-43.
122. Degidi M, Artese L, Scarano A, Perrotti V, Gehrke P, Piattelli A. Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol.* 2006; 77: 73-80.

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de defesa

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 10 de julho de 2018.

Maria Sílvia Maurício Rigolin