MARCO AURELIO ALVES FEITOSA

**Citocompatibilidade de discos de titânio tratados com cobertura usando
nanotecnologia de prata**

São Paulo

2012

MARCO AURELIO ALVES FEITOSA

**Citocompatibilidade de discos de titânio tratados com cobertura usando
nanotecnologia de prata**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Soares

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Feitosa, Marco Aurelio Alves.

Citocompatibilidade de discos de titânio tratados com cobertura usando nanotecnologia de prata / Marco Aurelio Alves Feitosa; orientador Mario Sergio Soares. -- São Paulo, 2012.

59 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Clínica Integrada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida de acordo com sugestões da Banca Examinadora em 27/04/2012

1. Fibroblastos. 2. Periodonto de proteção. 3. Titânio - Compatibilidade. 4. Implantes dentários. 5. Próteses e Implantes. 6. Nanotecnologia. 7. Prata. I. Soares, Mario Sergio. II. Título.

Feitosa MAA. Citocompatibilidade de discos de titânio tratados com cobertura usando nanotecnologia de prata apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A minha esposa Nancy e meus filhos Marco, Sabrina e Fernanda, pelo incentivo, e
companheirismo durante todas as jornadas.

Aos meus pais, pelo virtuoso exemplo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus meu criador pelos créditos concedidos através das vias que me permite percorrer.

Especial agradecimento ao Prof. Dr. Mario Sergio Soares, paciente e dedicado orientador deste trabalho, pelo incentivo e efetiva participação na minha busca pelo aperfeiçoamento como cidadão e agente promotor da excelência em Odontologia, assim como pela amizade, oportunidade e exemplar conduta na docência das ciências.

Ao Prof. Dr. Marcelo Munhóes Romano, pelo interesse , apoio e amizade oferecidos durante minha participação.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, pelo notável espírito de cooperação e pela grandeza que manifesta ao tornar acessível o seu conhecimento.

À dedicada e competente então Doutoranda Tatiani Ayako Goto Donato a “Tati”, pela dedicação, paciência e exemplar persistência em promover com sucesso o suporte devido à realização de meu trabalho.

Aos docentes e servidores da disciplina de Clínica Integrada pela acolhida e agradável convivência.

Às minhas colegas de Mestrado, Gisele, Roberta e Camila pela amizade, incentivo e saudável convivência.

À incansável Talita Girio Carnaval especial agradecimento pela amizade e inestimável cooperação.

Aos que aceitaram como encargo a tarefa de guardar e aperfeiçoar em todos os níveis o ideal daqueles que inspirados pela divindade criaram nossa FOUSP.

Muito Obrigado!

“Temos de nos tornar na mudança que queremos ver”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Feitosa MAA. Citocompatibilidade de discos de titânio tratados com cobertura usando nanotecnologia de prata [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

Os componentes protéticos que fazem a união entre implante e prótese são importantes para a manutenção da saúde peri-implantar sendo responsáveis pela vedação permucosa e impedindo a penetração de agentes químicos ou bacterianos desencadeadores de processos destrutivos nas estruturas ao redor do implante. Assim faz-se importante o desenvolvimento de técnicas que preservando as características de citocompatibilidade dos componentes protéticos que incorporem a sua estrutura, agentes antibacterianos que assegurem a saúde peri-implantar e que não permitam o desenvolvimento de resistência dos micro-organismos sendo ainda inócuos aos tecidos circunjacentes e ao organismo como um todo. Este trabalho teve o objetivo de testar a citocompatibilidade de discos de titânio com uma cobertura revestida usando nanotecnologia de prata em cultura de fibroblastos gengivais humanos. Discos de titânio de 5,9 mm foram preparados para o ensaio, sendo compostos por disco controle ST (N=1) sem nenhuma espécie de tratamento e disco com tratamento CT (N=3) com 3 camadas de cobertura com filme carregado com partículas de prata. O aditivo antimicrobiano à base de prata foi obtido pelo método *wet chemistry* por impregnação de metal homogeneamente distribuída sobre a superfície do disco. Fragmentos de gengiva foram cortados e colocados em placas de petri com meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco. Com aproximadamente 15 dias foram retirados os fragmentos de gengiva, seguido da tripsinização das células para sua expansão. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscópio de fase. Os FGHs (fibroblastos de gengiva humana) na terceira passagem (p3) foram contados em um hemocítômetro e plaqueados em placas de 96 e 24 poços. As análises foram feitas com 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. Após a solubilização, as soluções foram transferidas para uma nova placa de 96 poços, e efetuada a leitura. A citotoxicidade dos materiais foi avaliada por espectrofotometria no aparelho Leitor de Elisa, com comprimento de onda de 590 nm. As amostras foram metalizadas e o MEV foi usado

para avaliar a morfologia das células. O comportamento da cultura de fibroblastos sobre os discos de titânio em um período de 24 horas mostrou-se mais favorável na superfície ST mesmo após 48 horas quando CT apresentou valores inferiores ao ST, porém estatisticamente não significantes ao tempo de armazenamento. A avaliação após 72 horas indica que CT apresentou queda no desenvolvimento da cultura de fibroblastos em relação a ST sendo o resultado estatisticamente significativo o que sugere menor característica de citocompatibilidade do material utilizado no tratamento de superfície que se potencializa com o aumento do tempo de exposição visto que quando comparado aos demais espécimes com meio de cultura com nutrientes (CC), controle sobre a superfície da placa em H₂O sem nutrientes (H₂O) e controle sobre a superfície da placa com meio de cultura com nutrientes acrescido de fenol a 1 % (CM) o espécime CT somente teve valores absolutos superiores para presença das células quando comparado ao espécime CM. Nossos dados indicaram a necessidade de se promover aperfeiçoamento no complexo estrutural do material de cobertura dos discos de forma que se tornem mais citocompatíveis.

Palavras-chave: Fibroblasto. Prata. Citocompatibilidade.

ABSTRACT

Feitosa MAA. Cytocompatibility of titanium disks treated using silver nanotechnology [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

The prosthetic components that make the bond between implant and prosthesis are important for maintaining healthy peri-implant permucosal being responsible for sealing and preventing penetration of chemicals or bacterial triggers of destructive processes in the structures around the implant. So it is important to develop techniques that preserve the characteristics of cell compatibility of prosthetic components that incorporate its structure, antibacterial agents to ensure the peri-implant health and not allow the development of resistance of micro-organisms are harmless to the tissues even and surrounding the body as a whole. This study aimed to test the cell compatibility of titanium disks coated with a covering of silver using nanotechnology in cultured *human gingival fibroblasts*. Titanium disks of 5.9 mm were prepared for trial, being composed of hard control ST (N = 1) without any kind of treatment and treatment disc with CT (n = 3) with 3 layers of film cover loaded with silver particles. The additive antimicrobial silver-based was obtained by wet chemistry by impregnation of metal homogeneously distributed over the disk surface. Gingival fragments were distributed in petri dishes with culture medium Dulbecco's modified Eagle. With approximately 15 days they were removed, followed by trypsinization of the cells for their expansion. The culture medium were changed every 2-3 days of culture and progression was evaluated by phase microscopy. The FGHs (human gingival fibroblasts) in the third passage (p3) were counted in a hemocytometer and plated in a 96 and 24 wells. Analyses from 24, 48 and 72 hours after plating were made. After solubilization, the solutions were transferred to a new 96-well plate, and made reading. The cytotoxicity of the materials were evaluated by spectrophotometric ELISA reader device with a wavelength of 590 nm. The samples were metallized and SEM was used to assess cell morphology. The behavior of cultured fibroblasts on titanium disks in a period of 24 hours was more favorable on the surface of ST even after 48 hours when the CT were lower than the ST but not statistically significant at the time of storage. The evaluation after 72 hours indicates

that the CT fell in the development of cultured fibroblasts in relation to the ST and the result was statistically significant which suggests lower cell compatibility characteristic of the material used in surface treatment that enhances with increasing time exposure as compared to other disk with culture medium with nutrients (CC), control over the surface of the plate without nutrients H₂O and control over the surface of the plate with culture medium with nutrients plus phenol 1 % (CM) the CT only had higher absolute values for the presence of cells when compared to CM. Our data indicated the need to promote improvement in the structural complex of the covering material so that the disks become more compatibility.

Keywords: Fibroblast. Silver. Cytocompatibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Amostras ilustrativas de Microscópio invertido de contraste de fase: A- fragmento de gengiva em microscópio invertido de contraste de fase (500 X)7 dias; B- fragmento de gengiva em microscópio invertido de contraste de fase (500 X)15 dias	34
Gráfico 5.1 - Valores médios de Citotoxicidade Direta de H ₂ O nos diferentes tempos	38
Gráfico 5.2 - Valores médios de Citotoxicidade Direta de ST nos diferentes tempos ..	39
Gráfico 5.3 - Valores de Citotoxicidade Direta de CT nos diferentes tempos	40
Gráfico 5.4 - Valores de Citotoxicidade Direta de CC nos diferentes tempos	41
Gráfico 5.5 - Valores de Citotoxicidade Direta de CM nos diferentes tempos	42
Gráfico 6.1 - Valores de citotoxicidade direta nos diferentes tempos	45
Figura 6.1 - As figuras A, B, C, D, E e F apresentam cultura de fibroblastos de gengiva humana, dispostos sobre 3 superfícies distintas: A e B foram semeados sobre vidro; C e D foram semeados sobre Titânio sem tratamento de superfície e E e F sobre superfície de Titânio recoberta com prata.(500X)	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Valores médios de absorbância de H ₂ O a cada tempo de armazenamento	37
Tabela 5.2 - Valores médios de absorbância de ST a cada tempo de armazenamento	38
Tabela 5.3 - Valores médios de absorbância de CT a cada tempo de armazenamento	39
Tabela 5.4 - Valores médios de absorbância de CC a cada tempo de armazenamento	40
Tabela 5.5 - Valores médios de absorbância de CM a cada tempo de armazenamento	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	prata
CC	cultura sobre a superfície da placa com meio de cultura com nutrientes
CM	controle sobre a superfície da placa com meio de cultura com nutrientes acrescido de fenol a 1 % (controle de morte)
cps	corpos de prova
CT	com tratamento
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
FDA	sigla em inglês para <i>US Food and Drug Administration</i>
FGHs	sigla em inglês para <i>human gingival fibroblasts</i>
h	hora
H ₂ O	controle sobre a superfície da placa em H ₂ O sem nutrientes
HMDS	hexametildisilano
ICT	sigla em inglês para <i>apical extension of the inflammatory cell infiltrat</i>
kV	kilovolt
MEV	microscópio eletrônico de varredura
mg/L	miligrama por litro
mg/mL	miligrama por mililitro
mm	milímetro
MTT	3-4,5-dimetiltiazol-2yl-2,5-difenil brometo de tetrazolina
nm	nanômetro
p	significância estatística
PBS	sigla em inglês para <i>phosphate buffer solution</i>
SFB	soro fetal bovino
ST	sem tratamento
Ti-nAg	titânio revestido com nanopartícula de prata
TGF-β1	sigla em inglês para <i>transforming growth factor</i>
μL	microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Componente protético e sua relação com os tecidos peri-implantares.....	18
2.2 A prata e seus compostos	25
2.3 Cultura de Células	30
3 PROPOSIÇÃO	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Amostras dos Componentes Protéticos	33
4.2 Cultura de fibroblastos	33
4.3 Citotoxicidade Direta	35
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	35
4.5 Estudos Estatísticos	36
5 RESULTADOS.....	37
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXOS	54

1 INTRODUÇÃO

A reabilitação oral realizada sobre implantes osseointegráveis está embasada por conhecimentos disponibilizados há aproximadamente meio século e iniciados por Branemark. O desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas à osseointegração tem oferecido condições para que o restabelecimento das funções desempenhadas pelas estruturas implantares e suas respectivas próteses apresentem resultados cada vez mais previsíveis.

Diversos sistemas de implantes encontram-se disponíveis para que o Cirurgião Dentista possa indicá-los de acordo com a condição dos substratos ósseo e fibromucoso disponível no paciente, oferecendo variações na sua macrogeometria, tratamento de superfície (microgeometria), modelos de plataforma protética e sua relação com os componentes protéticos, que por sua vez também vem tendo sua forma e superfície otimizadas, para uma relação cada vez mais compatível com as exigências do tecido peri-implantar.

O grande desafio é tornar o desempenho do complexo implante-prótese cada vez mais próximo ao da raiz e coroa do dente natural, aperfeiçoando os componentes protéticos que promovem sua ligação, item de capital importância no estabelecimento de uma boa condição de saúde do tecido peri-implantar responsável pela vedação perimucosa, impedindo a penetração de substâncias químicas e bacterianas que condicionam processos destrutivos ao redor do implante.

Os biomateriais, principalmente o titânio e a zircônia, utilizados na construção de componentes protéticos para sua fixação aos implantes osseointegráveis têm apresentado bons resultados mecânicos e estéticos, todavia não oferecem, até o momento, propriedades que inviabilizam o desenvolvimento de microorganismos desencadeadores de patologias da região peri-implantar. Faz-se importante o desenvolvimento de técnicas que preservando as características de citocompatibilidade dos componentes protéticos; incorporem a sua estrutura, agentes antibacterianos que assegurem saúde peri-implantar e que não permitam o

desenvolvimento de resistência dos microorganismos à sua ação; sendo ainda inócuos aos tecidos circunjacentes e ao organismo como um todo.

Usando esta linha de raciocínio, alguns elementos como as cerâmicas, o titânio, o silício e a prata tem sido nanotecnologicamente empregados com êxito agregando propriedades importantes a produtos utilizados nas mais diversas áreas.

Devido a reputação de possuir propriedades antimicrobianas, a prata tem uma longa e intrincada história como “antibiótico” na saúde humana. Ela tem sido utilizada na purificação da água, no cuidado com feridas em variados níveis de concentração por conta do aumento da resistência bacteriana a antibióticos. Foi vista como uma alternativa para o revestimento de diversas superfícies de uso médico, como próteses ósseas em cirurgias ortopédicas reconstrutivas, dispositivos cardíacos, cateteres e aplicações cirúrgicas [1]. Compostos de hidroxiapatita tratados quimicamente com nitrato de prata e utilizados como cobertura de materiais utilizáveis em implantodontia comprovaram excelente efeito antibacteriano [2].

A prata e compostos inorgânicos de prata se ionizam na presença de água, fluidos corporais e exsudatos teciduais [1]. A biotecnologia avançada tem permitido a incorporação de prata ionizável para uso clínico, de modo a reduzir o risco de infecções. A ação antimicrobiana da prata e seus compostos são proporcionais a presença do íon prata bioativo (Ag^+) liberado e sua disponibilidade de interagir com membranas celulares de bactérias ou fungos [1-3]. Ensaio realizado por com prata associada a zeolite demonstraram efeito favorável quando utilizados para inibição bacteriana em condições anaeróbicas [4], sugerindo que esta associação pode ser um veículo útil na promoção de atividade antibacteriana para materiais dentários.

Desta forma é possível empregar tal propriedade, no desenvolvimento de componentes protéticos com superfície tratada a partir da incorporação de um filme usando nanotecnologia agregando partículas de prata procurando-se obter uma interface componente protético-mucosa peri-implantar livre da morbidade causada pela presença bacteriana.

Produtos com aplicação de antimicrobianos inorgânicos não apresentam halo de inibição, o que comprova a melhor fixação e distribuição do material tratado, proporcionando maior segurança e menor toxicidade evitando entre outros problemas, irritações e reações alérgicas, pois permanece no material tratado. Pela não migração do princípio ativo, permanece com sua eficiência por mais tempo, ou praticamente por toda vida do produto. O objetivo principal deste estudo será avaliar uma proposta de alteração superficial no componente protético.

A hipótese testada é a de que os discos confeccionados com titânio comercialmente puro incorporado com este filme, confirmem a biocompatibilidade com a mucosa peri-implantar demonstrada pela adesão e fixação de fibroblastos provenientes de cultura de células primária.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O conceito de sucesso na reabilitação com implantes está relacionado à sua longevidade. A preservação da boa condição da interface osso-implante não está condicionada unicamente ao dimensionamento e distribuição das cargas impostas pela prótese através dos diversos sistemas de conexão ao implante, mas também a toda uma estrutura que atua como verdadeira blindagem ao acesso de micro-organismos e outros agentes causadores de morbidade, além de sinalizar a existência de desequilíbrio da condição de saúde do complexo peri-implantar.

O elenco de propostas que estruturam tal conceito foi formalizado em 1978 na Conferência do Desenvolvimento de Consenso sobre Implantes Dentários ocorrida em Harvard, determinando que fosse considerada exitosa a técnica que contabilizasse 75% dos implantes mantidos em posição por 5 anos, posteriormente foi proposto que haveria sucesso quando 85% dos implantes se mantivessem por 5 anos e 80% em 10 anos [5]. Posteriormente foi considerada como exitosa a permanência de 90% dos implantes em 5 anos e 85% em 10 anos com saúde ótima ou satisfatória dos implantes, considerando-se também informações sobre a prótese [6]. Mais recentemente foi estabelecido pela edição 2007 do “Congress of Oral Implantologists Consenses Conference for Implant Success” uma relação de itens da escala de saúde e qualidade do implante cada vez mais rigorosa [7].

Desta forma a relação do implante com o componente protético vem assumindo um papel cada vez mais relevante na Implantodontia contemporânea, tanto em relação à biomecânica quanto a qualquer solução que melhorar sua relação com o tecido peri-implantar.

2.1 Componente protético e sua relação com os tecidos peri-implantares

A preservação da boa condição da interface implante e osso não está vinculada unicamente ao dimensionamento e distribuição das cargas impostas pela

prótese através dos diversos sistemas de conexão ao implante, mas também a toda uma estrutura que atua como verdadeira blindagem ao acesso de micro-organismos e outros agentes causadores de morbidade, além de sinalizar a existência de desequilíbrio da condição de saúde do complexo peri-implantar.

Os implantes dentais e seus componentes protéticos relacionam-se com três diferentes tipos de tecidos: o ósseo, o conjuntivo e o epitelial, e a transposição mucosa dos componentes protéticos determina uma exposição do conjunto ao meio bucal. A ausência de cimento na superfície do conjunto implante componente protético impede a fixação das fibras colágenas da faixa de tecido conjuntivo adjacente ao epitélio juncional conforme ocorre no dente natural, determinando que elas se disponham paralelamente ao longo eixo do implante ou circundando sua estrutura sendo a interface promovida apenas pelo contato direto de estruturas celulares de fibroblastos com a superfície do titânio.

Comprovadamente existe a formação de um sistema de inserção mucosa em torno ao componente protético compatível com a presença de diferentes biomateriais, com epitélio semelhante ao que ocorre em redor de dentes naturais [8,9]. Microscopia de luz e eletrônica revelaram a regeneração, a partir do epitélio gengival, de células epiteliais após a implantação, semelhantes a células encontradas no epitélio do sulco de dentes naturais e na região epitelial juncional e surgidas curtos períodos após a cirurgia de reabertura e colocação dos respectivos componentes protéticos [10,11].

Após a instalação do componente protético ocorre a regeneração da mucosa peri-implantar ao seu redor formando uma estrutura epitelial denominada margem gengival livre. É formada por um epitélio sulcular não queratinizado (crevicular), além de uma região com células epiteliais na base do sulco estabelecendo uma interface com sua superfície e ou do implante [8], produzindo uma série de estruturas de ligação, com fundamentos biológicos e fisiológicos próprios das células normais, formando posteriormente uma estrutura da lâmina basal onde predomina o colágeno tipo IV [12]. Por conta da formação de hemidesmossomas conectando as células epiteliais à lâmina basal e da produção pelas células epiteliais da enzima laminina, ocorre a união das várias camadas da lâmina basal [13,14].

A superfície do componente protético está em contato com uma estrutura composta por glicosamino-glicano chamada corpo linear, que é parte integrante da lâmina basal que integra o selo biológico e apesar de não estarem fisiologicamente aderidas ao biomaterial como estão no dente natural, os mucopolissacarídeos que formam o corpo linear tem consistência altamente viscosa que permite aderência à superfície do implante formando ligação biologicamente ativa na base do sulco gengival regenerado [15].

A intenção de preservar as respostas do tecido e minimizar a biodegradação restringe os tipos de materiais que podem ser utilizados para contato com os tecidos e com o meio bucal, devendo ocorrer, portanto, uma adaptabilidade biológica eficaz entre o componente protético e todos os tecidos envolvidos com o sistema estomatognático.

Contudo, a placa bacteriana cria um dinâmico e extremamente complexo ecossistema do biofilme oral [16,17], tal entendimento sugere que uma mudança nos fatores ou em um único fator no meio ambiente, pode ser um gatilho para a alteração do equilíbrio da microflora da placa bacteriana desencadeando estado de morbidade relacionado a espécies que dela fazem parte.

Sob condições normais de saúde a placa bacteriana desempenha importante ação de defesa ao hospedeiro, todavia também esta associada à cárie dental e doença periodontal, quando exposta a agentes incitantes das alterações metabólicas, tais como excesso de açúcar na dieta alimentar, hábito do fumo, prática ineficiente ou insuficiente da higiene oral, além de fatores imunológicos e genéticos do hospedeiro, afetando o ambiente oral, gerando condições que direcionam a placa bacteriana a provocar doença [18].

Doença periodontal reflete uma resposta inflamatória celular da gengiva e do tecido conjuntivo circundante, ao acúmulo de bactérias na superfície dental [19,20]. Tal resposta inflamatória é representada por duas classificações clínicas, que são a gengivite e a periodontite. Gengivite é medida clinicamente como uma inflamação da gengiva e é extremamente comum, periodontite também bastante comum ocorre

quando a placa induz uma resposta inflamatória do tecido gengival que promove a perda de adesão do colágeno entre o dente e o osso.

Cerca de 400 ou mais espécies bacterianas residem na placa subgengival, gram-negativas se posicionam alinhadas em relação ao epitélio do sulco, enquanto gram-positivas posicionam-se firmemente aderidas ao esmalte e raiz dental. A complexa interação entre as espécies subgengivais deve ser observada para orientar o tratamento periodontal, pois o enfraquecimento populacional de uma espécie pode estimular o avanço do crescimento de outras espécies do grupo [21].

A boa condição de saúde do sistema implante prótese é dependente da resposta da estrutura de suporte ósseo aos estímulos mecânicos resultantes da mastigação e também do equilíbrio entre os componentes da microbiota bucal e da relação desses micro-organismos com o ambiente [22].

Doenças peri-implantares são reações imunoinflamatórias, originadas nos tecidos que circunscrevem os implantes e são responsáveis pela futura perda de tecido ósseo e falência do implante exatamente como ocorre com os dentes, havendo também possibilidade de que estejam vinculadas a fatores sistêmicos de tal forma que a saúde peri-implantar não está inserida somente no contexto de saúde oral, mas se trata de fator determinante para manutenção da saúde em geral de cada indivíduo [23].

As doenças peri-implantares basicamente compreendem a mucosite, uma inflamação da mucosa que circunda o implante e a peri-implantite, que é uma inflamação da mucosa acompanhada de perda óssea peri-implantar. As inflamações periodontais e peri-implantares podem ser fatores de risco prováveis e viáveis de inúmeras condições de alterações gerais do organismo humano.

O delicado selo tecidual em torno do implante é fenotipicamente indistinguível daquele presente no complexo dente gengiva. É evidente que as doenças periodontais e peri-implantares não são fundamentalmente diferentes sob o aspecto da origem patogênica ou etiologia; as duas doenças representam uma resposta do hospedeiro ao desafio bacteriano causado pela formação do biofilme.

O desequilíbrio da microflora comumente encontrada na região peri-implantar que oferece interface com os componentes protéticos, quando não interceptada progride de um quadro inicial denominado mucosite para processo infeccioso grave que é a peri-implantite instalada ao redor do implante oferecendo como consequência final a falência da fixação implante osso [3,4,24-26]. Mucosite representa o obvio precursor da peri-implantite, assim como a gengivite é da periodontite, o tratamento da mucosite é pré requisito para a prevenção da peri-implantite [27,28].

A aderência de micro-organismos sobre as superfícies implantares e seus componentes protéticos é a principal fonte de infecção para os tecidos peri-implantares, portanto a microflora presente possui grande papel na evolução da doença, sendo assim sua redução, através de um rigoroso controle do biofilme, é uma grande preocupação no tratamento da peri-implantite e preservação do bom estado de saúde.

Estudos demonstram que a microbiota presente em bolsa ou sulco de dentes naturais é muito semelhante à presente em bolsa ou sulco peri-implantar, o que pode sugerir que a peri-implantite é promovida e induzida pelos mesmos mecanismos que a doença periodontal [10,11,24,25,29]. Sulcos peri-implantares saudáveis são colonizados por altas proporções de células cocóides, e a proporção de espécies anaeróbicas/aeróbicas é baixa. A contagem de células gram negativas anaeróbicas é pequena e a detecção de periodontopatógenos é muito baixa [3,15,24-26]. As bactérias frequentemente encontradas em implantes saudáveis e bem sucedidos são *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp. e *Capnocytophaga ochracea*.

Em implantes que apresentam sinais de inflamação peri-implantar, as bactérias encontradas com maior frequência foram: *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Campylobacter rectus*. Em bolsas acima de 6 mm as bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* são comumente encontradas [3,10,11,24-26].

Mesmo, contando-se com os mecanismos facilitadores que as novas tecnologias oferecem, a correta higiene bucal não consiste em tarefa ao alcance da maioria dos pacientes [30] particularmente daqueles que já tem histórico de perdas dentais ocasionadas por consequência da má escovação, agravada muitas vezes pela limitação motora e também por manifestações bucais de problemas sistêmicos.

Enquanto peri-implantite e periodontite possuem varias características clínicas em comum, diferenças estruturais no tecido de suporte entre implantes e dentes podem influenciar a resposta do hospedeiro à infecção. A análise dos dois tipos de lesão é importante na avaliação do diagnóstico e planejamento do protocolo do plano de tratamento da peri-implantite.

Tanto a peri-implantite quanto a periodontite apresentam grande quantidade de infiltração de células inflamatórias no sulco epitelial. A extensão apical do ICT (*apical extensión of the inflammatory cell infiltrate*) é mais pronunciada na peri-implantite do que na periodontite, sendo prevalentemente localizada mais para apical em relação ao sulco epitelial na maioria dos casos de peri-implantite, células plasmáticas e linfócitos predominam entre as células nos dois tipos de lesão e neutrófilos, granulócitos e macrófagos ocorrem mais em peri-implantite do que em periodontite [30,31].

A peri-implantite apresenta como característica alterações no nível da crista óssea em conjunto com a ocorrência de sangramento durante a sondagem; a secreção purulenta é um achado comum nos locais acometidos por peri-implantite.

Embora existam diferenças no desenvolvimento do epitélio juncional entre dente e implantes, a estrutura e função do selo epitelial em torno do dente e do implante são considerados idênticos. Todavia quando da ocorrência da periodontite uma cápsula de tecido de proteção se posiciona entre a lesão e o osso alveolar e tal barreira não ocorre no tecido peri-implantar permitindo que a lesão tenha contato direto com a crista óssea.

Dados histológicos de estudos experimentais da peri-implantite mostram a presença de ulceração epitelial em conjunto com o rompimento da adesão do tecido

conjuntivo. Isto sugere, embora nenhuma evidência de ocorrência natural esteja disponível, que o delicado tecido que forma o selo em torno ao implante é menos resistente facilitando assim a presença bacteriana e conseqüentemente as lesões peri-implantares.

Tem sido demonstrado através de diversos trabalhos que a microbiota do ambiente oral influencia em muito a composição da microbiota desenvolvida em torno do implante, condições patológicas no ambiente oral podem induzir mudanças no ecossistema que favoreçam a colonização de micro-organismos patogênicos nos sítios implantares [27,28,31].

Estudo observou a contaminação das partes internas dos implantes dentários pela penetração bacteriana, pois os implantes com sistema de duplo estágio em que a retenção do componente protético é feita por parafusos; apresentam fendas e cavidades entre o corpo do implante e o componente protético e tais espaços vazios podem agir como armadilhas para bactérias o que pode causar uma reação inflamatória nos delicados tecidos peri-implantares, pois a união implante componente protético esta posicionada normalmente no nível da crista alveolar tornando o espaço suscetível a colonização bacteriana [32].

A porção de tecido queratinizado peri-implantar exerce função importante no mecanismo de controle do biofilme dentário e manutenção da saúde peri-implantar. É possível observar a tendência clínica de inflamação por acúmulo de biofilmes nas áreas com insuficiência ou ausência de mucosa queratinizada em torno dos implantes dentários [33].

Os procedimentos preventivos e as ações curativas tradicionalmente utilizadas após a instalação dos quadros de mucosite e peri-implantite usualmente sugerem a associação com agentes quimioterápicos [30,34] o que pode ocasionar efeitos deletérios [35]. Evidências sugerem que após tratamento com um forte antimicrobiano como, por exemplo, a clorexidina uma sub população pode permanecer viável e proliferar [36,37] sendo resistentes ao tratamento podendo ainda aumentar o efeito patogênico da placa bacteriana.

2.2 A prata e seus compostos

A atividade antimicrobiana da prata foi primariamente identificada no século 19, e a prata coloidal foi aceita em 1920 pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) como sendo efetiva na manutenção de feridas [1]. Entretanto, após a introdução da penicilina em 1940, os antibióticos se tornaram o tratamento padrão para infecções bacterianas e a prata praticamente caiu em desuso [1]. Seu retorno, em 1960, como agente terapêutico na manutenção de feridas em pacientes queimados, foi consagrado, desta vez na forma de solução de nitrato de prata a 0,5% [1].

A prata é conhecida a muito tempo por exibir forte toxicidade a grande número de espécies de micro-organismos e por tal razão compostos a base de prata tem sido amplamente utilizados com aplicação bactericida. É positiva a referência de alguns exemplos de compostos inorgânicos com lenta liberação de percentuais de prata correntemente usados como conservantes de uma série de produtos, outra aplicação inclui novos feitos de microesferas de sílica gel que contem complexo de prata tiosulfato misturado a plástico como proteção antibacteriana de longa duração, compostos de prata são também usados no campo médico para tratamento de feridas e uma variedade de infecções [38].

Inovações tecnológicas sobre cobertura de materiais com antibióticos, antissépticos e prata têm sido explorados para reduzir o risco de infecções. Em vista do aumento da resistência bacteriana a antibióticos e antissépticos a cobertura com prata pode ser efetiva na estratégia para prevenir a infecção de aparelhos. O desenvolvimento de novas raças bacterianas resistentes às medicações de uso corrente tem trazido sérios problemas em saúde pública, todavia isto é um forte incentivo para o desenvolvimento de novos bactericidas. Recentes pesquisas com nanomateriais bactericidas apresentam-se particularmente oportunas.

Em comparação a outros íons de metais pesados a prata é provavelmente a mais utilizável por combinar alta atividade antimicrobiana com considerável baixa toxicidade humana [39].

Sais de prata, complexos de prata e prata sólida são usados em medicina sendo sua atividade biocida relatada através da atividade do íon prata presente em sais inorgânicos como o arginol e nitrato de prata como antimicrobiano tópico para o tratamento de problemas dermatológicos, o uso de nitrato de prata (1% solução) contra a oftalmia neonatal e o emprego da sulfadiazina de prata é consagrado na profilaxia de úlceras em membros inferiores. Diversos laboratórios e pesquisas animais sugerem forte atividade antimicrobiana em dispositivos recobertos com prata, entretanto estudos clínicos convincentes são raros.

O cátion prata (Ag^+) é bastante ativo quimicamente quando fortemente ligado a elétrons doados por grupos contendo enxofre, oxigênio ou nitrogênio e as moléculas biológicas geralmente contém tal conformação [39].

O efeito bactericida dos íons de prata em micro-organismos é muito conhecido, porém apenas parcialmente entendido. Foi proposto que o íon prata age fortemente com o grupo tiol de algumas enzimas inativando-as ou também se sugere que o DNA perde sua capacidade de replicação enquanto a bactéria é tratada com íons de prata. Outros estudos evidenciam a mudança estrutural da membrana celular assim como também a formação de pequenos grânulos formados por prata e enxofre [38].

A nanotecnologia é a ciência que compreende o desenvolvimento tecnológico dentro da escala nanométrica (entre 1 a 100 nm), aplicadas em várias áreas do conhecimento humano. Nanopartículas possuem características físico-químicas únicas, tais como alta proporção de área de superfície para massa e alta reatividade, o que muitas vezes proporciona efeitos maiores e mais duradouros [3]. Nanopartículas têm sido bem sucedidas em seu uso na área médica e farmacêutica, como carreador de agentes terapêuticos e no diagnóstico de doenças crônicas [3].

Estudos têm sido desenvolvidos para viabilizar esta inovação tecnológica em medicamentos, prolongando seus efeitos terapêuticos [40,41]. Outra utilidade das nanopartículas é na indústria alimentícia e têxtil com a função de limitar o crescimento bacteriano [3]. A principal vantagem de um aditivo bactericida de base nanotecnológica, é sua elevada área superficial, que permite uma área de contato

maior entre o componente ativo do aditivo bactericida (prata) e os micro-organismos, aumentando seu poder bacteriostático.

Partículas de metal em tamanho nanométrico apresentam propriedades físicas que são diferentes das apresentadas pelo íon e pela massa do material, tal fato determina a manifestação de notáveis propriedades tais como o aumento da atividade de catálise devido às inúmeras facetas ativas disponibilizadas por sua morfologia.

Experimento utilizando nanopartículas de prata e bactérias gram negativas (*E. Coli*, *V. Cholera*, *P. Aeruginosa*), permitiu conhecer três formas diferentes de ação sobre os micro-organismos: 1. Nanopartículas de prata entre 1- 10 nm aderem à superfície da membrana celular e drasticamente perturbam suas funções tais como permeabilidade e respiração. 2. Nanopartículas penetram no interior da bactéria causando prejuízo adicional por possível interação com compostos de fósforo e enxofre presentes no DNA. 3. As nanopartículas liberam íons prata os quais oferecem uma contribuição adicional para seu efeito bactericida [38].

Os íons de prata tiveram maior ação em bactérias gram negativas do que nas bactérias gram positivas. A camada de peptidoglicana possui carga negativa e provavelmente liga-se a alguns íons de prata que apresentam carga positiva (Ag^+). Como as bactérias gram negativas possuem menor número de camada peptidoglicana do que as gram positivas permitem mais facilmente que o Ag^+ chegue à membrana plasmática [4].

A ligação dos íons prata ao DNA bacteriano pode inibir um número importante de processos de transporte integrado com os mecanismos de oxidação celular e na cadeia respiratória. Quanto maior a concentração de íons prata maior a eficácia antimicrobiana, a percentagem de íon prata liberado pode estar relacionada com a atividade antimicrobiana dos dispositivos revestidos com prata.

O íon prata ultrapassando a membrana bacteriana por processo de adesão induz efeito bacteriostático, aumentando a concentração de prata de forma competitiva com a parte externa da membrana pode-se observar que as superfícies

com cobertura antimicrobiana devem possuir propriedades bactericidas, na presença de superfície bacteriostática algumas bactérias resistentes podem sobreviver e estar aptas a colonizar a superfície revestida com a possibilidade de provocar severas infecções.

A concentração de íons prata livre é fundamental no direcionamento da função bacteriostática ou bactericida sendo importante considerar no uso de tecnologias para cobertura com prata que a concentração de íons prata além de 10 mg/L pode ser tóxica para certas células humanas, tendo-se observado citotoxicidade de cateteres impregnados com prata sobre células fibroblásticas humanas [39].

A eficácia antimicrobiana do nitrato de prata em uso ocular neonatal é devido a alta concentração (1000mg/L) pela ausência de quantidades suficientes de albumina à qual devem permanecer adsorvidos os íons prata, isto pode ser entendido que a prata aderida nem sempre tem atividade antimicrobiana, no tratamento de feridas a prata-sulfadiazina tem sua eficácia associada a ação sinérgica dos íons prata com a sulfonamida e a alta concentração local (10000mg/L).

Diversos compostos de prata foram avaliados na prevenção da contaminação de dispositivos de uso médico; o efeito antimicrobiano observado é diretamente relacionado à concentração de íons prata, acima de 150mg/L [39].

Entretanto nos ambientes contendo albumina e íons haletos (fluoreto, cloreto, brometo, iodeto) os efeitos antimicrobianos do íon prata poderão diminuir como resultado do processo específico de absorção com albumina e precipitação como cloreto de prata insolúvel.

Na área médica se desenvolvem estudos para viabilizar medicamentos prolongando seus efeitos terapêuticos [40,41] e a aplicação de nanopartículas de prata, que tem ação bactericida, para a confecção de tecidos utilizados em curativos, assim como desenvolvem e fornecem soluções na área da nanotecnologia ligadas a síntese de óxidos, metais e compósitos nanoestruturados e tratamentos de superfícies para a obtenção de propriedades especiais. Alguns elementos como

cerâmicas, titânio, silício, prata tem sido nanotecnologicamente empregados com êxito agregando propriedades importantes a produtos utilizados nas mais diversas áreas.

Experimentos realizados *in vitro* utilizando-se cimento ósseo a base de polimetilmetacrilato utilizado para ancoragem de articulações artificiais carregado com nanopartículas de prata a 1% revelou alta atividade antibacteriana e ausência de toxicidade quando em cultura de fibroblastos de ratos e osteoblastos humanos [42].

Embora um pequeno grupo de pesquisadores tenha investigado a toxicidade dos nanocompósitos de prata e nanopartículas em linhagens celulares para estimar sua viabilidade e a geração de ROS (reactive oxygen species) que são moléculas instáveis e extremamente reativas produzidas em grande quantidade durante o stress oxidativo e capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. É pequeno o conhecimento sobre os mecanismos de toxicidade das nanopartículas de prata, recentes artigos estabeleceram seu envolvimento na interferência com o metabolismo da mitocôndria e alterações na função pulmonar e inflamação provocada através de experimentos *in vivo* em ratos [43].

Discos de titânio com superfície modificada por nanopartículas de prata usando-se o método de silanização teve ação antibacteriana confirmada contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, referidas como as bactérias patogênicas mais comumente encontradas em biomateriais infectados sendo consideradas apropriadas para testar as propriedades antimicrobianas da superfície do Ti-nAg. O mecanismo antibacteriano foi creditado à presença de nanopartículas de prata e pela liberação de íons de prata, as nanopartículas de prata demonstram boa propriedade antimicrobiana devido sua grande área de superfície o que proporciona um efetivo contato com os micro-organismos. As nanopartículas liberam íons prata em ambiente aquoso o que ressalta sua ação bactericida, foi demonstrado que os íons prata ligam-se firmemente a elétrons doados por tecidos biológicos que contém enxofre, oxigênio e nitrogênio [44].

Foi demonstrado que além da propriedade antibacteriana, discos de titânio recobertos com nanopartículas de prata apresentaram boa propriedade anti-adesiva bacteriana quando comparados com discos de titânio polidos, não tendo sido detectado efeito citotóxico dos discos de titânio com superfície carregada por nanopartículas de prata em cultura de fibroblastos humanos [45].

2.3 Cultura de Células

A criação, desenvolvimento e avaliação do desempenho dos biomateriais já consagrados quando na formulação convencional, enriquecidos por novas propostas tecnológicas orientadas para a conquista de maior longevidade funcional dos implantes e componentes protéticos, conquistam validação científica através de pesquisas clínicas. No momento atual os modelos “*in vitro*” creditam com maior facilidade e precisão a validade de tais propostas.

O uso de métodos “*in vitro*”, tem permitido a desaceleração dos experimentos realizados em animais e possibilita a redução de tempo para obtenção dos resultados, assim como também o custo financeiro dos projetos [46].

A possibilidade de se programar a análise do comportamento celular dos tecidos envolvidos com materiais de interesse na reabilitação através de implantes dentários, se fortalece quando tem seu planejamento viabilizado pelos estudos realizados *in vitro*, ou seja, meio de cultura de células animais.

Cultura de células refere-se à cultura derivada de células dispersas retiradas do tecido original, de uma cultura primária ou de uma linhagem de células obtidas por desagregação enzimática, mecânica ou química. O desenvolvimento de estudos a partir de cultura de células permite eficiente controle físico-químico do ambiente (pH, temperatura, pressão osmótica e tensão de O^2 e CO^2), condições fisiológicas que podem ser mantidas relativamente constantes e nem sempre podem ser definidas no homem e no animal. Muitas linhagens de células requerem suplementação do meio com soro ou outro constituinte essencial, que pode ser

gradualmente oferecido e repostado, além da possibilidade de homogeneização das amostras e a possibilidade de se aproveitar 100% a ação dos reagentes que in vivo é parcialmente perdida pela excreção e distribuição nos tecidos, alguns cuidados, entretanto, são indispensáveis para garantia de resultados satisfatórios tais como necessidade de total condição de assepsia, pois as células animais crescem lentamente em relação aos agentes contaminantes tais como bactérias, leveduras e fungos, além disso ao contrario dos micro-organismos células de animais multicelulares não existem isoladamente e conseqüentemente não são capazes de manter-se sem a existência de um ambiente simulando plasma sanguíneo ou fluido intersticial [24].

Estudos “in vitro” com a proposta de avaliação da citocompatibilidade de biomateriais utilizados no desenvolvimento de implantes e componentes protéticos em relação aos tecidos peri-implantares são conduzidos em meio de cultura de fibroblastos a partir de fragmentos de gengiva humana aderidas em substrato apropriado, podendo também ser isoladas do tecido por desagregação mecânica ou enzimática, produzindo uma suspensão de células constituindo assim linhagem de células denominada como cultura primária [24], assim como também pode o estudo ser desenvolvido em cultura de células existentes em estoque tais como por exemplo fibroblastos NIH-3T3 obtidas a partir de embrião de rato suíço NIH [47], ou ainda a linhagem de fibroblastos L929, também originaria de ratos, citada como referência para testes de citotoxicidade em polímeros [48].

A cobertura de componentes protéticos com um material desenvolvido com alta tecnologia nanométrica utilizando a prata para criar uma barreira ativa de proteção contra bactérias pode ser um desafio a ser perseguido. Produtos com aplicação de antimicrobianos inorgânicos não apresentam halo de inibição, o que comprova a melhor fixação e distribuição do material tratado, proporcionando maior segurança e menor toxicidade evitando entre outros problemas, irritações e reações alérgicas, pois permanece no material tratado. Pela não migração do princípio ativo, permanece com sua eficiência por mais tempo, ou praticamente por toda vida do produto.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve o objetivo de testar a citocompatibilidade de discos de titânio preparados da mesma forma que componentes protéticos, usando nanocobertura com partículas de prata em cultura de fibroblastos gengivais humanos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras dos Componentes Protéticos

Os discos de titânio comercialmente puro tratados da mesma forma que são preparados para usinagem dos componentes protéticos da marca Pross® (Dabi Atlante) foram previamente preparados para o ensaio com diâmetro de 5,9 mm. Um disco foi usado como controle sem nenhuma espécie de tratamento (ST) e outro disco recebeu tratamento de superfície (CT) com 3 camadas de um filme que contem nanotecnologia com partículas de prata, produzido pela empresa Nanox Tecnologia S.A. O aditivo antimicrobiano natural à base de prata a partir do preparo de nanopartículas de prata pelo método *wet chemistry* (imersão), reduzindo a prata a um colóide que foi ancorado em sílica, pelo método de impregnação de metal sobre suporte homogeneamente distribuída sobre a superfície do disco. O disco foi tratado termicamente em fornos com atmosfera ambiente.

4.2 Cultura de fibroblastos

O cultivo das células foi realizado no Laboratório de Cultivo Celular do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). A linhagem celular de fibroblastos de gengiva humana (FGH) foi obtida através de fragmentos de mucosa inserida humana, provenientes de pacientes submetidos à cirurgia para colocação de implantes dentários. Esses tecidos foram utilizados para a pesquisa com o consentimento esclarecido dos pacientes e aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa para Humanos da FOUSP (FR336150 Protocolo 85/2010), (Anexo A) não apresentando quaisquer implicações, senão aqueles inerentes ao próprio procedimento cirúrgico.

Os fragmentos de gengiva foram cortados em frações menores e colocados em placas de petri com meio de cultura *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM,

Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) e 1% de gentamicina (Sigma®). A partir de 7 dias, as células começaram a migrar dos fragmentos e com aproximadamente 15 dias, a placa de petri estava com 90% de confluência (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Amostras ilustrativas de Microscópio invertido de contraste de fase: A-fragmento de gengiva em microscópio invertido de contraste de fase (500 X) 7 dias; B-fragmento de gengiva em microscópio invertido de contraste de fase (500 X) 15 dias

Nesse momento, foram retirados os fragmentos de gengiva, seguido da tripsinização das células para sua expansão.

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para manter a esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular. As células foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscópio de fase. Os fibroblastos (FGHs) na terceira passagem (p3) foram contados em um hemocitômetro (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e plaqueados em placas de 96 e 24 poços conforme o objetivo.

4.3 Citotoxicidade Direta

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (Corning®). As células plaqueadas sobre os discos ST e CT, com densidade de 110 células/mm². Foi usado como controle negativo de citotoxicidade a própria placa de poliestireno (controle com nutrientes – CC) como controle positivo, uma solução de fenol 1% (controle de morte – CM); controle sobre a superfície da placa em H₂O sem nutrientes (H₂O). As análises foram feitas com 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. Transcorridos os tempos experimentais, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados com PBS estéril. Em seguida, foi colocado 90 µL de meio de cultura com 10% SFB, mais 10 µL de (3-4,5-dimetiltiazol-2yl-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT); 5 mg/mL em tampão fosfato-salino (PBS estéril) em cada poço e incubados a 37°C por 3 horas. Passado esse período, a solução foi retirada e os poços lavados com tampão PBS. Em seguida, foi adicionado 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), por 15 minutos em temperatura ambiente, para solubilizar os cristais de coloração azul/violeta, formados pela clivagem dos anéis de tetrazolium pela enzima succinato-desidrogenase (SDH) das mitocôndrias ativas. Após a solubilização, as soluções foram transferidas para uma nova placa de 96 poços, e efetuada a leitura. A citotoxicidade dos materiais foi avaliada por espectrofotometria no aparelho Leitor de Elisa (ELX 800 – Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instruments, ICC, USA), com comprimento de onda de 590 nm. Todos os testes foram realizados em duplicata com n=4.

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi usada para avaliarmos a morfologia das células, para isso, as células foram cultivadas sobre os discos de titânio com e sem cobertura e como controle de adesão usamos uma lamínula de vidro. A análise foi feita após 24 horas do plaqueamento das células. O meio de cultura foi retirado e os poços lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4, em seguida as amostras foram fixadas com solução 0,1% de glutaraldeído + 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M - pH 7,4 por uma hora em temperatura ambiente. Transcorrido esse

período, as amostras foram lavadas e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1%, por 30 minutos. A seguir, as amostras foram desidratadas em crescente de etanóis e, logo após, secas com hexametildisilizano (HMDS) a 100% e fixadas em suportes de alumínio. Finalmente, as amostras foram metalizadas no aparelho Bal-Tec SCD 050, com uma camada de aproximadamente 25 nm de ouro, e examinadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 430, operado com 15 kV.

4.5 Estudos Estatísticos

Todos os testes foram executados com auxílio do programa BioEstat 5.0 e Prism os gráficos e tabelas elaborados no Microsoft Excel versão Office XP. Para comparação entre os grupos se utilizou testes paramétricos de análise de variância (ANOVA e complementação com teste de Tukey). Para comparação entre os tempos de crescimento foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal Wallis para identificação do P e complementação com teste de Student-Newman para a identificação da diferença entre os tempos.

5 RESULTADOS

Dados experimentais

Os dados deste experimento representam a análise de 4 discos (cps) em três diferentes tempos de armazenamento 24h, 48h ou 72h, totalizando a análise de 12 discos de cultura. Os valores absolutos foram apresentados no (Anexo B).

Na tabela 5.1 estão descritos os valores médios de absorbância de H₂O a cada tempo de armazenamento. Pode se observar uma redução gradual das médias de absorbância quanto maior o tempo de armazenamento, sendo que 72 horas de armazenamento apresenta médias inferiores a 24 horas.

Tabela 5.1 - Valores médios de absorbância de H₂O a cada tempo de armazenamento

H2O		
24	48	72
0.107	0.073	0.08
0.96	0.086	0.065
0.114	0.075	0.07
0.107	0.085	0.061

No histograma do gráfico 5.1 é possível constatar que o grupo H₂O apresentou diferença significativa apenas entre 24 h e 72 h ($p < 0.05$). Já a comparação entre 24h e 48h ou 48h e 72 não apresentou diferença significante ($p > 0.05$), demonstrando a influência do tempo de armazenamento no crescimento de fibroblastos.

Gráfico 5.1 – Valores médios de Citotoxicidade Direta de H₂O nos diferentes tempos

Na tabela 5.2 é possível observar que os valores médios do grupo ST a cada tempo demonstram-se equilibrados não demonstrando significância de aumento ou redução de valores com o passar do tempo de crescimento ($p > 0.05$).

Tabela 5.2 - Valores médios de absorbância de ST a cada tempo de armazenamento

ST		
24	48	72
0.098	0.098	0.104
0.086	0.099	0.11
0.102	0.091	0.092
0.100	0.088	0.081

O gráfico 5.2 salientou que quando não há tratamento de superfície (grupo ST) tanto para 24h x 48h; 24h x 72h ou 48h x 72h não há diferença nas médias de absorbância ($p > 0.05$).

Gráfico 5.2 – Valores médios de Citotoxicidade Direta de ST nos diferentes tempos

Também na tabela 5.3 pode-se observar que há pouca discrepância entre os valores médios do grupo CT quando comparada os tempos de crescimento ($p > 0.05$).

Tabela 5.3 - Valores médios de absorbância de CT a cada tempo de armazenamento

CT		
24	48	72
0.093	0.016	0.046
0.075	0.078	0.045
0.087	0.084	0.057
0.067	0.092	0.075

O histograma do gráfico 5.3 também confirmou não existir diferença entre os tempos 24h x 48h; 24h x 72h ou 48h x 72h ($p > 0.05$) para o grupo CT.

Gráfico 5.3 – Valores de Citotoxicidade Direta de CT nos diferentes tempos

O grupo que representa o controle positivo experimental CC (Controle de Cultura) confirmou com a tabela 5.4 que o tempo de armazenamento influencia positivamente no crescimento de fibroblastos sendo observado um aumento gradual de absorbância de 24h até 72 h.

Tabela 5.4 - Valores médios de absorbância de CC a cada tempo de armazenamento

CC		
24	48	72
0.109	0.124	0.15
0.111	0.13	0.141
0.112	0.119	0.114
0.115	0.147	0.128

O gráfico 5.4 confirma que o grupo CC foi o que sofreu maior influência sobre o tempo de armazenamento, desta forma o tempo de 24h x 48h; 24h x 72h ou 48h x 72h de armazenamento foram diferentes significativamente quanto ao crescimento de fibroblastos ($p < 0.05$).

Gráfico 5.4 – Valores de Citotoxicidade Direta de CC nos diferentes tempos

Já o grupo CM que representa o controle negativo experimental CC demonstrou através da tabela 5.5, que o armazenamento em fenol 1% influencia negativamente na morte de fibroblastos ao longo do tempo.

Tabela 5.5 - Valores médios de absorbância de CM a cada tempo de armazenamento

CM		
24	48	72
0.04	0.032	0.01
0.034	0.03	0.023
0.041	0.028	0.025
0.045	0.024	0.02

No gráfico 5.5 é possível observar que embora o tempo de armazenamento influencia negativamente no crescimento de fibroblastos para o grupo CM, apenas a diferença entre 24h e 72h foi marcada significativamente por menor absorbância ($p < 0.05$).

Gráfico 5.5 – Valores de Citotoxicidade Direta de CM nos diferentes tempos

O comportamento da cultura de fibroblastos sobre os discos de Titânio sem tratamento de superfície (ST) e Titânio com tratamento de superfície (CT) em um período de 24 horas mostrou-se mais favorável na superfície sem tratamento o mesmo ocorrendo após 48 horas quando o grupo CT apresentou valores inferiores ao grupo sem tratamento, porém estatisticamente não significantes ao tempo de armazenamento, a avaliação após 72 horas indica que o Titânio com tratamento de superfície (CT) apresentou queda no desenvolvimento da cultura de fibroblastos em relação ao Titânio sem tratamento de superfície (ST) sendo o resultado estatisticamente significativo o que sugere menor característica de citocompatibilidade do material utilizado no tratamento de superfície que se potencializa com o aumento do tempo de exposição, pois quando comparado com os demais grupos de controle: cultura sobre a superfície da placa com meio de cultura com nutrientes (CC), controle sobre a superfície da placa em H₂O sem nutrientes (H₂O) e controle sobre a superfície da placa com meio de cultura com nutrientes acrescido de fenol a 1 % (CM) o grupo CT somente teve valores absolutos superiores para presença das células quando comparado ao grupo CM.

6 DISCUSSÃO

Na Implantodontia atual, muitos dos desafios como a melhoria da superfície e da biomecânica, tanto da fixação do implante como do componente protético, têm apresentado soluções inovadoras, mas a colonização das superfícies implantares e peri-implantares pelas bactérias e a tentativa de seu controle continua desafiando os pesquisadores. As melhores práticas para a sobrevivência de qualquer implante é evitar a adesão de microorganismos nas superfícies dos dispositivos implantados. Desta forma, o contínuo aparecimento de resistência aos antibióticos em microorganismos oportunistas e patogênicos obriga a comunidade científica a desenvolver constantemente novos fármacos e drogas alvo [1,38,49].

Nas últimas décadas, foram desenvolvidas diversas estratégias para prevenir ou reduzir colonização bacteriana da superfície tanto dos implantes como dos componentes protéticos. Tais estratégias incluem: modificações na superfície através do polimento e modificação das propriedades físicas da superfície livre de energia; e devido à demonstração da atividade antimicrobiana pelas nanopartículas o desenvolvimento de novas aplicações neste campo faz delas uma alternativa atrativa aos antibióticos [38]. Desta forma a deposição de um filme usando nanotecnologia incluindo partículas de prata caminha nesta direção, ou seja, a criação de um ambiente hostil aos microorganismos.

A aplicação das nanopartículas em vários campos do conhecimento humano, nos últimos anos, tem se expandido consideravelmente, pois possuem características físico-químicas únicas, como alta percentagem de área de superfície, alta reatividade e tamanho da magnitude do nanômetro. Têm sido utilizadas com sucesso em nanoengenharia médica e farmacêutica para agentes terapêuticos de liberação controlada e no diagnóstico de doenças crônicas [40,41]. Elas também têm ainda sido usadas na indústria do vestuário e da alimentação para limitar o crescimento bacteriano. Apresenta habilidade em reduzir infecções microbianas na pele e em feridas por queimadura, além da prevenção de colonização bacteriana na superfície de dispositivos cirúrgicos como cateteres e próteses.

A despeito do rápido progresso e aceitação precoce da biónanotecnologia, o potencial para efeitos adversos devido à exposição prolongada a vários níveis de concentração, em humanos ainda não está bem estabelecido, havendo indícios de que sua toxicidade também tem abrangência em células humanas [43]. O controle da toxicidade da nanopartícula de prata utilizada como agente antimicrobiano e paralelamente compatível com as células de mamíferos deve ser objeto de estudo dos pesquisadores [49].

As nanopartículas de prata tem ganhado muita popularidade devido a seu amplo espectro e atividade antimicrobiana sendo extensivamente usada em preparações tópicas e para saturar bandagens para assim restringir o crescimento bacteriano em pele injuriada. Embora o efeito antimicrobiano dos derivados da prata sejam bem documentados, o mecanismo pelo qual ela exerce sua bioatividade não é bem conhecida. Embora muitos estudos sejam focados na aplicação das nanopartículas, estudos descrevendo o impacto delas na saúde humana são limitados. Poucos trabalhos sobre a toxicidade das nanopartículas de prata estão disponíveis, sendo que seus efeitos tóxicos têm sido reportados em células de mamíferos incluindo alteração da função normal da mitocôndria, o aumento da permeabilidade da membrana e a geração de espécies oxigênio reativas [43] *stress* oxidativo, prejuízos ao DNA e apoptose [50].

Observando nossos resultados, o grupo com tratamento usando nanotecnologia com partículas de prata (CT) apresentou diferença em relação ao grupo sem tratamento (ST) tanto no crescimento de 24h quanto de 72h ($p < 0.05$). O grupo controle negativo ou controle de morte (CM) apresentou diferença significativa ($p < 0.05$) em relação aos demais grupos, em todos os tempos de crescimento, exceto em relação a CT e CM nas 48h ($p > 0.05$). O grupo ST apresentou diferença ($p < 0.05$) em relação a CM em todos os tempos de análise. Já o grupo ST apresentou diferença em relação a H₂O apenas nas 72 horas de crescimento ($p < 0.05$).

Gráfico 6.1 – Valores de citotoxicidade direta nos diferentes tempos

Ao observarmos o gráfico 6.1 que é a síntese dos gráficos 5.1-5.5 pode se confirmar que no controle positivo (placa de poliestireno - CC) os fibroblastos tiveram um crescimento satisfatório nos 3 tempos estudados. Ao contrário, no controle negativo (fenol-CM) o crescimento decresce em proporções semelhantes nos 3 tempos mostrando citotoxicidade e tendência de morte celular.

Os discos sem a cobertura (ST) os fibroblastos apresentaram crescimento favorável permanecendo estável nos tempos 24, 48 e 72 horas. Ao contrário nos discos com cobertura, os fibroblastos aumentaram nos períodos de 24 para 48 horas mas decresceram no período de 48 para 72 horas. Este fato pode ser melhor esclarecido ao observar a figura 6.1, que através da microscopia eletrônica de varredura demonstra o encolhimento dos fibroblastos em relação a lamínula de vidro (controle positivo), nos tempos 48 e 72 horas.

A hipótese mais viável para este fato pode estar relacionada a citotoxicidade da superfície preparada, pois a adição de cinco camadas de prata, embora tenha aumentado o poder de cobertura superficial, pode ter aumentado consideravelmente a concentração de prata.

A figura 6.1 apresenta cultura de fibroblastos de gengiva humana, dispostos sobre 3 superfícies distintas: A e B foram semeados sobre vidro; C e D foram semeados sobre titânio sem tratamento de superfície e E e F sobre superfície de titânio recoberta com prata. O desenvolvimento se mostra diferente nas 3 superfícies sendo que sobre vidro as células apresentam-se em maior número e com aspecto morfológico característico quando comparados com a cultura desenvolvida sobre o titânio sem tratamento que revela uma quantidade menor de células na mesma área, mantendo ainda morfologia característica. A observação do desenvolvimento da cultura de fibroblastos em superfície de titânio recoberta por prata revela um reduzido número de células quando comparada com as superfícies anteriores e alteração morfológica. Tal avaliação sugere que a superfície de titânio tratada com prata quando comparada com a superfície de titânio sem tratamento e a superfície de vidro, sugere uma condição pouco ideal para o crescimento da cultura de fibroblastos indicando possivelmente uma tendência compatível com citotoxicidade.

Figura 6.1 - As figuras A, B, C, D, E e F apresentam cultura de fibroblastos de gengiva humana, dispostos sobre 3 superfícies distintas: A e B foram semeados sobre vidro; C e D foram semeados sobre Titânio sem tratamento de superfície e E e F sobre superfície de Titânio recoberta com prata.(500X)

Liao [45] usaram o método silanização para depositar as nanopartículas de prata nas superfícies de titânio e testando a citocompatibilidade, no ensaio MTT, o crescimento de fibroblastos humanos provenientes de gengiva humana (como em nosso estudo) não foi inibido na superfície contendo nanopartículas de prata em comparação com a superfície polida do titânio. Coloração fluorescente do citoesqueleto da célula sugere que a morfologia de célula não foi afetada pela superfície modificada. Exames de MEV mostraram também que células na superfície mantiveram uma arquitetura normal.

Os dados aqui apresentados demonstram que houve uma tendência de citotoxicidade deste tipo de preparação de cobertura. Como as partículas de prata estão reduzidas a um colóide que foi ancorado em sílica; o substrato pode estar exercendo tal atividade citotóxica, portanto deveria ser testado isoladamente. Estes achados transpostos para microorganismos poderia ser interessante na adesão e prevenção da colonização bacteriana. De qualquer forma estudos precisam ser realizados aumentando a amostragem e o desempenho da cobertura usando partículas de prata em componentes protéticos.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, de acordo com a metodologia empregada, a cobertura onde as partículas de prata estão reduzidas a um colóide ancorado em sílica demonstrou citotoxicidade detectável em fibroblastos de gengiva humana cultivadas. Estes dados sugerem que este tipo de cobertura deve ser aperfeiçoado para melhoria da citocompatibilidade, para no futuro procurarmos seu desempenho sobre células bacterianas comuns na microflora peri-implantar.

REFERÊNCIAS¹

- 1- Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a case for concern?. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Apr;59(4):587-90. Epub 2007 Feb 16. Review.

- 2- Feng QL, Kim TN, Wu J, Park ES, Kim JO, Lim DY, Cui FZ. Antibacterial effects of Ag-HAp thin films on alumina substrates. *Thin Solid Films.* 1998 Nov;335(1-2):214-9.

- 3- Martinez-Gutierrez F, Olive PL, Banuelos A, Orrantia E, Nino N, Sanchez EM, Ruiz F, Bach H, Av-Gay Y. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine.* 2010 Oct6(5):681-8. Epub 2010 Mar 6. doi:10.1016/j.nano.2010.

- 4- Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater.* 2000 Nov;16(6):452-5.

- 5- Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1986 Summer;1(1):11-25.

- 6- Misch CE, editor. Contemporary implant dentistry. St Louis: Mosby; 1993. Implant success or failure: clinical assessment in implant dentistry, p. 29-42.

- 7- Misch CE, Perel ML, Wang HL, Sammartino G, Galindo-Moreno P, Trisi P, Steigmann M, Rebaudi A, Palti A, Pikos MA, Schwartz-Arad D, Choukroun J, Gutierrez-Perez JL, Marenzi G, Valavanis DK. Implant success, survival, and failure: the International Congress of Oral Implantologists (ICOI) Pisa Consensus Conference. *Implant Dent.* 2008 Mar;17(1):5-15.

- 8- McKinney RV Jr, Stefflik DE, Koth DL. Ultrastructural surface topography of the single crystal sapphire endosseous dental implant. *J Oral Implantol.* 1984;11(3):327-40.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

- 9- Hashimoto M, Akagawa Y, Nikai H, Tsuru H. Ultrastructure of the peri-implant junctional epithelium on single-crystal sapphire endosseous dental implant loaded with functional stress. *J Oral Rehabil.* 1989 May;16(3):261-70.

- 10- James RA, Kelln EE. A histopathological report on the nature of the epithelium and underlying connective tissue which surrounds oral implants. *J Biomed Mater Res.* 1974;8(4 Pt 2):373-83.

- 11- Swope EM, James RA. A longitudinal study on hemidesmosome formation at the dental implant-tissue overflow. *J Oral Implantol.* 1981;9(3):412-22.

- 12- McKinney RV Jr, Steflik DE, Koth DL. Evidence for a junctional epithelial attachment to ceramic dental implants. A transmission electron microscopic study. *J Periodontol.* 1985 Oct;56(10):579-91.

- 13- Campbell JH, Terranova VP. Laminin: molecular organization and biological function. *J Oral Pathol.* 1988 Aug;17(7):309-23.

- 14- McKinney RV Jr, Steflick DE, Koth DL, Singh BB. The scientific basis for dental implant therapy. *J Dent Educ.* 1988 Dec;52(12):696-705.

- 15- Smithloff M, Fritz ME. The use of blade implants in a selected population of partially edentulous adults. A 15-year report. *J Periodontol.* 1987 Sep;58(9):589-93.

- 16- Bowden GHW. The microbial ecology of dental caries. *Microb Ecol Health Dis.* 2000;12(3):138-48.

- 17- Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006 Jun 15;6 Suppl 1:S14.

- 18- Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010 Jan;89(1):8-18.

- 19- Loesche W. Dental caries and periodontitis: contrasting two infections that have medical implications. *Infect Dis Clin North Am.* 2007 Jun;21(2):471-502.

20- Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1560-8.

21- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25(2):134-44.

22- Konopka A. Microbial ecology: searching for principles- the extraordinary diversity of microbial ecosystems complicates efforts to develop principles encompassing microbial ecology. *Microbe.* 2006;1(4):175-9.

23- Saba-Chujfi E, Pereira SAS, Saba AK. Prevenção das doenças periimplantares. *Periodontia.* 2008;18(4):54-61.

24- Freshney RI. Culture of animal cells. 2nd. ed. New York: Wiley-Liss; 2000. 397 p.

25- Misch CE. Implantes dentais contemporâneos. 1a ed. São Paulo: Ed. Santos; 2006. 685 p.

26- Siqueira JTT. Implantes de titânio, cilíndricos, com superfície rugosa por jateamento. *Rev Bras Implant.* 1996 Set-Out;2(5):7-11.

27- Lang NP, Bosshardt DD, Lulic M, Do Mucositis lesions around implants differ from gingivitis lesions around teeth?. *J Clin Periodontol.* 2011 Mar;38 Suppl 11:182-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01667.

28- Lang NP, Berglundh T. Periimplant diseases: where are we now? - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011 Mar;38 Suppl 11:178-81. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01674.

29- Shibata Y, Miyazaki T. Anode glow discharge plasma treatment enhances calcium phosphate adsorption onto titanium plates. *J Dent Res.* 2002 Dec;81(12):841-4.

30- Lotufo RFM, Pannuti CM, Calil CM, Feng HS, Sekiguchi RT, Carvalho VF. Controle químico do biofilme dentário supragengival: revisão de literatura. *Periodontia.* 2009 mar.;19(1):34-9.

- 31- Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are Peri-implantitis lesions diferente from periodontitis lesions?. J Clin Periodontol. 2011 Mar;38 Suppl 11:188-202. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01672.x
- 32- do Nascimento C, Barbosa RE, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, Albuquerque RF Jr. Bacterial leakage along the implant-abutment interface of premachined or cast components. Int J Oral Maxillofac Surg. 2008 Feb;37(2):177-80. Epub 2007 Oct 10.
- 33- Chung DM, Oh TJ, Shotwell JL, Misch CE, Wang HL. Significance of keratinized mucosa in maintenance of dental implants with different surfaces. J Periodontol. 2006 Aug;77(8):1410-20.
- 34- Trejo PM, Bonaventura G, Weng D, Caffesse RG, Bragger U, Lang NP. Effect of mechanical and antiseptic therapy on peri-implant mucositis: an experimental study in monkeys. Clin Oral Implants Res. 2006 Jun;17(3):294-304.
- 35- Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y. The antimicrobial approach to caries management. J Dent Educ. 2001 Oct;65(10):1091-5.
- 36- Gilbert P, Allison DG, McBain AJ. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance?. J App Microbiol. 2002;92 Suppl:98S-110S. Review.
- 37- McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. Appl Environ Microbiol. 2003 Aug;69(8):4770-6.
- 38- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005 Oct;16(10):2346-53. Epub 2005 Aug 26.
- 39- Schierholz JM, Lucas LJ, Rump A, Pulverer G. Efficacy of silver-coated medical devices. J Hosp Infect. 1998 Dec;40(4):257-62.
- 40- Duranm N, Duran M, Tasic L, Marcato PD. Tecnologia de nanocristais em fármacos. Quim Nova. 2000;33(1): 151-8.

- 41- Rossi-Bergmann B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. *Ciênc Cult*. 2008 abr.-jun.;60(2):54-7.
- 42- Volker A, Thorsten B, Steinrucke P, Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E, Schnettler R. An in vitro assessment of antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(18):4383-91.
- 43- AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009 Feb 24;3(2):279-90.
- 44- Juan L, Zhimin Z, Anchun M, Lei L, Jingchao Z. Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *Int J Nanomedicine*. 2010 Apr 15;5:261-7.
- 45- Liao J, Anchun M, Zhu Z, Quan Y. Antibacterial titanium plate deposited by silver nanoparticles exhibits cell compatibility. *Int J Nanomedicine*. 2010 May 13;5:337-42.
- 46- Kumari TV, Vasudev V, Kumar A, Menon B. Cell Surface Interactions in the study of biocompatibility. *Trends Biomater Artif Organs*. 2002;15(2):37-41.
- 47- Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*. 1963 May;17:299-313.
- 48- Serrano MC, Pagani R, Vallet-Regí M, Peña J, Rámila A, Izquierdo I, Portolés MT. In vitro biocompatibility assessment of poly (epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*. 2004 Nov;25(25):5603-11.
- 49- Cao H, Liu X. Silver nanoparticles-modified films versus biomedical device-associated infections. *Wiley Interdiscipl rev nanomed nanobiotechnol*. 2010 nov – dez 2(6):670-684.
- 50- Ahamed M, Alsalhi MS, Siddiqui MK. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta*. 2010 Dec 14;411(23-24):1841-8. Epub 2010 Aug 16.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****Comitê de Ética em Pesquisa****PARECER DE APROVAÇÃO
FR336150
Protocolo 85/2010**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o Projeto de pesquisa **“Estudo da citocompatibilidade da superfície de componentes protéticos com cobertura de prata coloidal submetidos à cultura de células fibroblásticas”**, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Letícia Klain Cristofolletti, sob orientação do(a) Prof.(a.) Dr.(a.) Mario Sergio Soares.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em “cd”. Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 18 de agosto de 2010.

Profa. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B – Resultados em valores absolutos

Os dados experimentais descritos na tabela B.1 representam a análise dos 4 corpos de prova (cps), sendo também apresentados os valores das médias aritméticas e desvios padrões após 24 horas de armazenamento.

Tabela B.1 - Valores absolutos, média aritmética e desvio padrão dos grupos após 24 horas

24 horas						
Grupo	Valores absolutos				Média	Desv. Padrão
H2O	0,107	0,096	0,114	0,107	0,11	0,006
ST	0,098	0,086	0,102	0,101	0,10	0,006
CT	0,093	0,075	0,087	0,067	0,08	0,010
CC	0,109	0,111	0,112	0,115	0,11	0,002
CM	0,04	0,034	0,041	0,045	0,04	0,004

No histograma abaixo (Gráfico B.1) é possível observar os valores absolutos de absorbância (590nm) após armazenamento e crescimento das culturas por 24 h. Ainda é possível visualizar que conforme esperado o grupo de controle de morte CM e controle de cultura CC, apresentam respectivamente menores e maiores absorbâncias absolutas.

Gráfico B.1 - Valores absolutos de absorbância (590nm) dos grupos após 24 h

Já na tabela B.2 estão apresentados os valores absolutos, médias aritméticas e desvios padrões após 48 horas de armazenamento dos grupos para o crescimento.

Na comparação desta tabela B.2 com a tabela B.1 é possível observar que após 48 horas de armazenamento apenas o grupo CC teve média de absorbância (590nm) superior a média absorbância no armazenamento de 24 horas.

Tabela B.2 – Valores absolutos, média aritmética e desvio padrão dos grupos após 48 horas

48 horas						
Grupo	Valores absolutos				Média	Desv. Padrão
H2O	0,073	0,086	0,075	0,085	0,08	0,006
ST	0,098	0,099	0,091	0,088	0,09	0,005
CT	0,116	0,078	0,084	0,092	0,09	0,014
CC	0,124	0,13	0,119	0,147	0,13	0,011
CM	0,032	0,03	0,028	0,024	0,03	0,003

No gráfico B.2 é possível observar que o grupo CT apresentou valores absolutos inferiores a ST, porém não foram significantes ($p > 0.05$) a este tempo de armazenamento.

Gráfico B.2 - Valores absolutos de absorbância (590nm) dos grupos após 48 h

Na tabela B.3 estão os dados experimentais dos 4 corpos de prova (cps) após 72 horas de crescimento. Observa-se que apenas os grupos CT e CM apresentaram queda da média de absorbância de 0,09 para 0,06 e 0,03 para 0,02,

respectivamente na comparação das 72 horas de crescimento em relação a 48 horas.

Tabela B.3 – Valores absolutos, média aritmética e desvio padrão dos grupos após 72horas

72 horas						
Grupo	Valores absolutos				Média	Desv. Padrão
H2O	0,08	0,065	0,07	0,061	0,07	0,007
ST	0,104	0,11	0,092	0,081	0,10	0,011
CT	0,046	0,045	0,057	0,075	0,06	0,012
CC	0,15	0,141	0,114	0,128	0,13	0,014
CM	0,01	0,023	0,025	0,015	0,02	0,006

No gráfico B.3 ficou claro que o grupo CT teve menores valores absolutos de absorbância (590nm) e significantes em relação aos demais grupos ($p < 0.05$), exceto ao grupo CM.

Gráfico B.3 - Valores absolutos de absorbância (590nm) dos grupos após 72 h

Nas considerações das médias dos diferentes tempos de crescimento 24,48 e 72 horas (Tabela B.4) é possível observar uma queda gradual das médias de absorbância em todos os grupos, exceto para o grupo CC, que conforme esperado pelas características experimentais representa um controle positivo de cultura celular, sendo portanto observado o aumento de crescimento de 24 h para 72 h.

Tabela B.4 - Valores médios da citotoxicidade direta através da absorbâncias (590nm) dos grupos ao longo do tempo

Grupo	Tempo		
	24	48	72
H2O	0,11	0,08	0,07
ST	0,10	0,09	0,10
CT	0,08	0,09	0,06
CC	0,11	0,13	0,13
CM	0,04	0,03	0,02

A tabela B.5 apresenta o erro padrão (EP) referente a cada tempo de crescimento celular. Nela podemos constatar que há um equilíbrio entre os valores de EP nos diferentes tempos, além disso observa-se que todos os grupos apresentaram um valor pequeno de EP demonstrando que o número de cps foi o suficiente para as determinadas avaliações experimentais.

Tabela B.5 - Valores do $\pm$ Erro Padrão da absorbâncias (590nm) dos grupos ao longo do tempo

Grupo	Tempo		
	24	48	72
H2O	0,004	0,004	0,004
ST	0,004	0,002	0,006
CT	0,006	0,008	0,007
CC	0,001	0,006	0,008
CM	0,002	0,001	0,003

Os valores médios de citotoxicidade direta por absorbância (590nm) estão apresentados no gráfico B.4, onde é possível observar através da representação de asterisco a significância entre os grupos (Tabela B.6). O grupo CT apresentou diferença em relação ao ST tanto no crescimento de 24h quanto de 72h ($p < 0.05$). O grupo CM apresentou diferença significativa ($p < 0.05$) em relação aos demais grupos, em todos os tempos de crescimento, exceto em relação a CT e CM nas 48h ($p > 0.05$). O grupo ST apresentou diferença ($p < 0.05$) em relação a CM em todos os tempos de análise. Já o grupo ST apresentou diferença em relação a H₂O apenas nas 72 horas de crescimento ($p < 0.05$). O quadro de códigos do gráfico B.4.

Gráfico B.4 – Valores da citotoxicidade direta (absorbância 590nm) nos diferentes tempo

Tabela B.6 - Códigos de significância do Gráfico 5.4 (* = $p < 0.05$)

Análise de significância $p < 0.05 = *$																	
24						48						72					
	H2O	ST	CT	CC	CM		H2O	ST	CT	CC	CM		H2O	ST	CT	CC	CM
H2O		ns	*	ns	*	H2O		ns	ns	ns	ns	H2O		*	ns	*	*
ST			*	ns	*	ST			ns	ns	*	ST			*	*	*
CT				*	*	CT				ns	ns	CT				*	*
CC					*	CC					*	CC					*
CM						CM						CM					