CHRISTIANA FONTÃO KASSAB

**Citocompatibilidade de filmes nanoestruturados associados à prata aplicados sobre
titânio: análise em cultura de osteoblastos**

São Paulo

2015

CHRISTIANA FONTÃO KASSAB

**Citocompatibilidade de filmes nanoestruturados associados à prata aplicados sobre
titânio: análise em cultura de osteoblastos**

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. Carlos Adde

São Paulo

2015

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

Kassab, Christiana Fontão.

Citocompatibilidade de filmes nanoestruturados associados à prata aplicados sobre titânio: análise em cultura de osteoblastos / Christiana Fontão Kassab; orientador Carlos Adde -- São Paulo, 2015.

83 p. : il. : 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.

1. Implante dentário endoósseo. 2. Prata - Toxicidade. 3. Nanotecnologia. 4. Biomateriais - Odontologia. 5. Osteoblasto. I. Adde, Carlos Alberto. II. Título.

Kassab CF. Citocompatibilidade de filmes nanoestruturados associados à prata aplicados sobre titânio: análise em cultura de osteoblastos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovada em: 17 / 04 / 2015

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). MARIO SERGIO SOMIS

Instituição: FOUSP Julgamento: APROVADA

Prof (a). Dr (a). CARLOS ALBERTO ADDE

Instituição: FOUSP Julgamento: APROVADA

Prof (a). Dr (a). SIGMAR DE MELLO RODE

Instituição: ICT-SJC-UNESP Julgamento: APROVADA

À minha amada mãe, Rosa Maria, uma vencedora, que sempre admirou meu trabalho e, por tantas lutas que enfrentou com determinação em sua vida, inspirou-me a não desistir, mesmo diante das muitas adversidades.

Ao meu esposo, Ricardo, e aos meus filhos, Mariane e Gabriel, pelo intenso amor, compreensão e paciência, cujo carinho me amparou, mantendo-me firme e perseverante nas dificuldades, sempre aliados às minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aquele que está acima de todas as coisas, governos e autoridades, sem o qual nada existiria e que, por Seu infinito amor e bondade, concedeu a mim o privilégio de participar desta empreitada, de modo a engrandecer o Seu nome.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Mário Sérgio Soares, o qual permitiu meu ingresso nesta importante pesquisa. Com imensa paciência, sabedoria, caráter e liderança, soube me orientar e corrigir, sempre respeitando as limitações inerentes à condição humana, o que contribuiu para meu crescimento científico, intelectual e profissional.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chaves, pela vital cooperação e acessibilidade em partilhar experiência e conhecimentos, concedendo a honra de colaborar diretamente na realização dos experimentos, e ainda permitindo o acesso ilimitado às instalações e materiais do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

À Giovanna de Castro Ribeiro dos Santos, Laboratório de Biologia Oral, que incansavelmente participou diretamente dos experimentos e proporcionou suporte em todos os processos, contribuindo com maturidade, responsabilidade e dedicação, sem os quais não seria possível realizar esta pesquisa.

Ao prof. Dr. Marcelo Munhóes Romano, por sua atenção na condução deste trabalho, como co-orientador, parceiro e amigo, a mim representando o referencial de um verdadeiro mestre.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Adde, pelo acolhimento em meu regresso à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, oferecendo sempre seu carinho, apoio e amizade, acompanhando meu crescimento e amadurecimento, os quais culminaram em meu aprimoramento acadêmico.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti, por sua generosidade em todos os momentos desta jornada, sempre prestativa em oferecer amparo e compartilhar sua sabedoria, com muita humildade, instigando e aguçando anseios por conhecimento e respostas para indagações, o que muito contribuiu nesta pesquisa.

À dedicada Júlia Almeida Smanio, minha colega de mestrado e parceira, por sua amizade e cooperação.

Ao Prof. Marco Aurélio Feitosa, por dividir comigo sua experiência, com mansidão e paciência, enxergou minha competência e incentivou-me a ingressar no programa de mestrado.

A todos os docentes, secretária e funcionários da disciplina de Clínica Integrada, pelo imenso apoio e apreço por meu trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Oral, os quais contribuíram para que os experimentos pudessem ser realizados.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo fomento financeiro para a realização desta pesquisa, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

“Uma pessoa inteligente resolve um problema,
um sábio o previne.”

Albert Einstein

RESUMO

Kassab CF. Citocompatibilidade de filmes nanoestruturados associados à prata aplicados sobre titânio: análise em cultura de osteoblastos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

A contaminação dos implantes e seus componentes protéticos por patógenos específicos, ainda é um problema a ser resolvido na Implantodontia. Nanoestruturas associadas à prata, aplicadas em superfície de titânio, têm sido investigadas e vêm demonstrando inibir significativamente a adesão, crescimento e colonização de uma vasta gama de microrganismos patogênicos, inclusive os resistentes a antibióticos. O objetivo deste experimento foi verificar a presença de toxicidade de nanoestruturas associadas à prata, aplicadas à superfície de titânio, frente a cultura de osteoblastos, visando desenvolver um material biocompatível, promissor na corrida pela prevenção da colonização bacteriana dos implantes. Discos de titânio comercialmente puro foram revestidos com três tipos diferentes filmes nanoestruturados. As amostras foram expostas a culturas de linhagens imortalizadas de osteoblastos (MC3T3-E1) e submetidas a ensaios de toxicidade direta (MTT), após 24h, 48h e 72h de incubação, a fim de determinar a taxa de proliferação e redução da viabilidade celular. Além disso, para verificar adesão e morfologia celular, foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após 24h de incubação. No ensaio de toxicidade celular MTT, após 48h de incubação, as superfícies nanoestruturadas, nomeadas TiAg, TiAA e SiO₂, comportaram-se de maneira muito similar ao grupo controle de titânio puro (Ti) ($p < 0,05$). O grupo SiO₂ registrou maior absorbância em 24h, com diferença relevante em relação a todos os outros grupos (testes e controles). Em MEV foram verificadas uma morfologia celular compatível com viabilidade e presença de adesão dos osteoblastos em todas as superfícies testadas, similar aos grupos controles. Dessa forma, verificou-se que os três filmes nanoestruturados demonstraram biocompatibilidade a osteoblastos.

Palavras-chave: Implante dentário Prata Nanotecnologia Biomaterial Biocompatibilidade.

ABSTRACT

Kassab CF. Biocompatibility of nanostructured films associated to silver applied on titanium: analysis in osteoblasts culture [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida

Contamination of implants and their prosthetic components by specific pathogens is still a problem to be solved in Implantology. Nanostructures associated to silver applied on titanium surface have been investigating, and have showing to inhibit significantly the adhesion, and growth of a broad range of pathogenic microorganisms, including antibiotic-resistant ones. The aim of this experiment was to verify the presence of toxicity in nanostructures associated to silver applied to titanium surface against osteoblast culture, in order to develop a biocompatible promising material in the race for prevention on implants bacterial colonization. Each commercially pure titanium disk received one of three different nanostructured films: SiO₂, TiAg, and TiAA. Samples have exposed to cultures of immortalized lines osteoblasts (MC3T3-E1), and submitted to direct toxicity assay (MTT) after 24h, 48h and 72h of incubation to determine the proliferation rate and cell viability reduction. Furthermore, to verify adhesion and cell morphology, Scanning Electron Microscopy (SEM) has performed after 24h incubation. The 48h MTT cell toxicity assay showed similarity in results among test surfaces and pure titanium control group (Ti) ($p < 0.05$). The SiO₂ group registered higher absorbance in 24h, with significant difference regarding to all other groups (tests and controls). SEM exhibited cell morphology indicative of viability, and presence of osteoblast adhesion on all test surfaces, similar to control groups. Thus, it found of that three nanostructured films demonstrated osteoblasts compatibility.

Keywords: Dental implant Silver Nanotechnology Biomaterials Biocompatibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 4.1-Composição do meio/solvente e sistema químico, de cada solução coloidal, e composição, concentração e tamanho das partículas ativas, Ag ou TiO_2 , associadas às nanoestruturas.....	432
Gráfico 5.1-Comparação das médias de absorbâncias nos tempos experimentais, demonstrando a progressão da cultura na amostra Ti.....	54
Gráfico 5.2-Comparação das médias de absorbâncias nos tempos experimentais, demonstrando a progressão da cultura na amostra TiAg.....	55
Gráfico 5.3-Comparação das médias de absorbâncias nos tempos experimentais, demonstrando a progressão da cultura no grupo TiAA	56
Gráfico 5.4-Comparação das médias de absorbâncias nos tempos experimentais, demonstrando a progressão da cultura no grupo SiO_2	57
Gráfico 5.5-Comparação das médias de absorbâncias nos tempos experimentais (24h, 48h e 72h), demonstrando a progressão da cultura no grupo CN.....	58
Gráfico 5.6-Comparação das médias de absorbâncias entre os grupos após 24h de incubação	59
Gráfico 5.7-Comparação das médias de absorbâncias entre os grupos após 48h de incubação	60
Gráfico 5.8-Comparação das médias de absorbâncias entre os grupos após 72h de incubação	61
Gráfico 5.9-Comparação das curvas de progressão das culturas entre os grupos, determinadas pelas médias das absorbâncias registradas nas leituras das amostras (MTT), no decorrer dos tempos experimentais	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1-Esquema de deposição por dip-coating	41
Figura 4.2-Imagem em MEV-FEG das superfícies: Substrato em titânio sem deposição (Ti) e com deposição das soluções coloidais SiO_2 , TiAA e TiAg. Aumento original de 1.000X	44
Figura 4.3-Detalhamento, por MEG-FEG, das superfícies de cada amostra Ti, SiO_2 , TiAA e TiAg. Aumento original de 30.000X.....	45
Figura 4.4-Detalhamento, por MEV-FEG, da deposição das partículas dos ativos nas superfícies SiO_2 e TiAA: SiO_2 exibe a deposição de partículas de sílica (mais escura) e, logo acima, Ag (mais clara); TiAA apresenta partículas de TiO_2 . Aumento original de 80.000X.....	46
Figura 4.5-Imagens, por MEV-FEG, da deposição de partículas do ativo na superfície TiAg, com aumento original de 30.000X; no detalhe, as deposições dos cristais de Ag dispersas. Aumento original de 300.000X.....	46
Figura 4.6-Imagem representativa do resultado da análise química por EDX do substrato em titânio sem deposição (controle Ti).....	47
Figura 4.7-Imagem representativa do resultado da análise química por EDX da amostra de substrato em titânio com deposição da solução coloidal SiO_2	47
Figura 4.8-Imagem representativa do resultado da análise química por EDX da amostra de substrato em titânio com deposição da solução coloidal TiAA	48
Figura 4.9-Imagem representativa do resultado da análise química por EDX da amostra de substrato em titânio com deposição da solução coloidal TiAg.....	48
Figura 5.1-Micrografia eletrônica representativa, mostrando detalhamento das superfícies, após 24h de incubação em cultura de osteoblastos. Foi constatada presença de células aderidas (setas) e espalhadas em todas as superfícies testadas no	

experimento (TiAg TiAA e SiO₂), em densidade muito próxima à observada nos grupos controles Lm e Ti. Aumento original: 1.500X63

Figura 5.2-Micrografias eletrônicas representativas, mostrando detalhamento da topografia das superfícies após o cultivo celular: a) SiO₂ com-superfície lisa e homogênea; b) TiAA com topografia rugosa, aspecto pontilhado; c) TiAg: sítio com microtrincas - aspecto “craquelado”; d) TiAg: sítio com cobertura danificada - regiões ausentes de células aderidas. Aumento original: 3.000X; e) Aspecto geral da amostra TiAg. Aumento original: 40X.....64

Figura 5.3-Micrografias eletrônicas representativas, mostrando detalhes dos osteoblastos cultivados sobre as superfícies. Filopódios (setas) visualizados nas membranas celulares sobre as amostras SiO₂, Ti, TiAA e Lm, indicam adesão celular às superfícies. Aumento original: 10.000X66

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1-Valores das absorbâncias registrados nas leituras dos ensaios de MTT	53
Tabela 5.2-Resultados referentes às amostras do grupo Ti, relativos às absorbâncias obtidas das leituras do MTT nos três tempos experimentais (24h, 48h e 72h).....	54
Tabela 5.3-Comparações múltiplas dentro do grupo Ti, entre os tempos experimentais, para determinar a progressão da cultura	54
Tabela 5.4-Resultados referentes às amostras do grupo TiAg, relativos às absorbâncias obtidas das leituras do MTT nos três tempos experimentais	55
Tabela 5.5-Comparações múltiplas dentro do grupo TiAg, entre os tempos experimentais, para determinar a progressão da cultura	55
Tabela 5.6-Resultados referentes às amostras do grupo TiAA, relativos às absorbâncias obtidas das leituras do MTT nos três tempos experimentais	56
Tabela 5.7-Comparações múltiplas dentro do grupo TiAA, entre os tempos experimentais, para determinar a progressão da cultura	56
Tabela 5.8-Resultados referentes às amostras do grupo SiO ₂ , relativos às absorbâncias obtidas das leituras do MTT nos três tempos experimentais	57
Tabela 5.9-Comparações múltiplas dentro do grupo SiO ₂ , entre os tempos experimentais, para determinar a progressão da cultura	57
Tabela 5.10-Resultados referentes às amostras do grupo CN, relativos às absorbâncias obtidas das leituras do MTT nos três tempos experimentais	58
Tabela 5.11-Comparações múltiplas dentro do grupo CN, entre os tempos experimentais, para determinar a progressão da cultura	58
Tabela 5.12-Resultados obtidos das absorbâncias registradas na leitura do MTT, por grupo de amostra, após 24h de incubação	59

Tabela 5.13-Comparações múltiplas, para determinar as diferenças entre as absorbâncias registradas na leitura do MTT das amostras, após 24h de incubação.....	59
Tabela 5.14-Resultados obtidos das absorbâncias registradas na leitura do MTT, por grupo de amostra, após 48h de incubação.....	60
Tabela 5.15-Comparações múltiplas, para determinar as diferenças entre as absorbâncias registradas na leitura do MTT das amostras, após 48h de incubação.....	60
Tabela 5.16-Resultados obtidos das absorbâncias registradas na leitura do MTT, por grupo de amostra, após 72h de incubação.....	61
Tabela 5.17-Comparações múltiplas, para determinar as diferenças entre as absorbâncias registradas na leitura do MTT das amostras, após 72h de incubação.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Ag	Prata
Ag ⁺	Íon de prata
AgNp	Nanopartícula (s) de prata
<i>C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
Células/mm ²	Células por milímetro elevado à segunda potência ou ao quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
CN	Grupo controle negativo (sem disco), somente com nutrientes, no ensaio MTT
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDX	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
h	Hora (s)
ICC	International Computer Concepts
kV	Quilovolt (s)
Lm	Grupo controle de morfologia e adesão da MEV
M	Molar
MC3T3-E1	Linhagem imortalizada de odontoblastos oriundos de calvária de camundongos.
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FEG	Microscópio Eletrônico de Varredura de alta resolução: MEV- microscópio FEG-VP Zeiss Supra 35 e DRX.
mg/m ²	Miligrama por metro elevado à segunda potência
mg/mL	Miligrama (s) por mililitro
mm	Milímetro (s)

MTT	Teste de redução Methyl Thiazolyl Tetrazolium ou (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nm	Nanômetro (s)
O ₂	Oxigênio
ON	Ontário
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PBS	Solução tampão <i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PPM	Parte (s) por milhão
<i>S aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Scanning Electron Microscopy correspondente em inglês de MEV
SFB	Soro Fetal Bovino
SiO ₂	Filme nanoestruturado a base de associação de prata com dióxido de sílica
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tanerella forsythia</i>
Telomerase hTRT	Telomerase Transcriptase Reversa
Ti	Titânio
TiAA	Filme nanoestruturado a base de dióxido de titânio
TiAg	Filme nanoestruturado a base de associação de prata com titânio
TiO ₂	Dióxido de titânio
vs	contra (<i>versus</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

p	Valor-p ou nível descritivo
<	Menor (es)
%	Por cento
μm	Micrômetro (s)
®	Marca registrada
X	vezes
nº	Número
°C	Grau (s) Celsius
μL	Microlitro (s)
+	mais
δ	Desvio padrão
=	Igual
≥	Maior ou igual
>	Maior (es)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1	OS TECIDOS PERI-IMPLANTARES.....	24
2.2	CONTAMINAÇÃO DO IMPLANTE.....	25
2.3	PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DA PRATA E SUA BIOCOMPATIBILIDADE.....	29
2.4	REVESTIMENTOS NANOESTRUTURADOS.....	32
2.5	TÉCNICAS DE DEPOSIÇÃO DE FILMES NANOESTRUTURADOS.....	34
2.6	CULTURA CELULAR.....	35
3	PROPOSIÇÃO.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1	AMOSTRAS	40
4.2	CULTURA CELULAR.....	49
4.3	TESTE DE TOXICIDADE DIRETA.....	49
4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	50
4.5	METODOLOGIA DE ANÁLISE DE DADOS	51
5	RESULTADOS.....	53
5.1	MTT	53
5.1.1	Progressão da cultura de osteoblastos no grupo Ti	54
5.1.2	Progressão da cultura de osteoblastos no grupo TiAg	55
5.1.3	Progressão da cultura de osteoblastos no grupo TiAA.....	56
5.1.4	Progressão da cultura de osteoblastos no grupo SiO ₂	57
5.1.5	Progressão da cultura de osteoblastos no grupo CN.....	58
5.1.6	Comparações entre as amostras após 24 h.....	59
5.1.7	Comparações entre as amostras após 48 h.....	60
5.1.8	Comparações entre as amostras após 72 h.....	61
5.1.9	Avaliação entre os grupos e os tempos experimentais	62

5.2	MEV	63
6	DISCUSSÃO.....	67
7	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXO A - Parecer da comissão de ética no uso de animais (ceua).....	84

1 INTRODUÇÃO

Desde os estudos realizados por Branemark (1), no intento de obter a reabilitação bucal através de implantes osseointegráveis, a busca pelo desenvolvimento de tecnologias, sejam elas aplicadas aos implantes diretamente ou aos componentes protéticos, têm alcançado maior previsibilidade em seus resultados, o que é altamente benéfico e desejável para o sucesso do tratamento.

O titânio tem sido amplamente utilizado como um excelente biomaterial em implantes dentários, já que possui biocompatibilidade e resistência à corrosão, o que favorece a osseointegração (2). Porém, existem múltiplos fatores que afetam os resultados do tratamento, tais como os relacionados à própria osseointegração, à manutenção da altura do osso de sustentação peri-implantar (3) e ao grau de agregação bacteriana ao redor dos implantes (4).

Na fase inicial, após a implantação, o sistema de defesa local fica severamente perturbado pelo trauma cirúrgico. Mesmo após a conclusão da osseointegração, a capacidade de defesa na interface implante-osso pode ficar comprometida, em virtude de diversos fatores sistêmicos e locais (5-9), o que facilita ainda mais a infiltração de bactérias patogênicas e instalação de uma infecção peri-implantar.

Como os sistemas de implantes dentários não só penetram em osso, mas ultrapassam a barreira gengival, uma solução de continuidade com o meio bucal é estabelecida, o que proporciona uma potencial exposição do organismo à população bacteriana presente na cavidade oral. A fixação e infiltração do biofilme peri-implanto patogênico no epitélio leva ao comprometimento dos tecidos peri-implantares, primeiramente por uma inflamação da mucosa (mucosite peri-implantar), até acometer a interface implante-osso, com supuração e reabsorção óssea progressiva (peri-implantite) (10-11).

Em cada passo da reabilitação protética sobre implantes dentários, o controle microbiológico irá determinar a longevidade do tratamento (12-14), visto ser possível ocorrer sua colonização por microrganismos peri-implanto-patogênicos, independentemente de todos os cuidados por parte do profissional, equipe e paciente (15).

Os próprios dentes remanescentes podem servir como fonte contaminante aos implantes (16).

Os sistemas de implantes estão em constante evolução para favorecer a osseointegração, como os tratamentos de superfícies, conferindo rugosidades e propriedades químicas (2, 17-19). Contudo, essas mesmas alterações, em suas macro e microestruturas, levam ao aumento dos riscos de adesão do biofilme bacteriano peri-implanto patogênico e dificultam sobremaneira a desinfecção das superfícies (20). Efetivada a instalação da peri-implantite, a superfície do implante passa a ser colonizada por microrganismos patogênicos, independentemente de sua topografia (21).

Existem inúmeras terapias que podem controlar a evolução da patologia peri-implantar em seus diversos estágios (19, 22-23). Muito se tem pesquisado no intuito de realizar o controle microbiológico e minimizar a agressão promovida por patógenos presentes no biofilme bucal, desde o uso de antibióticos sistêmicos até mecanismos de liberação local controlada (23-24). Todavia, todos esses esquemas posológicos possuem uma eficácia restrita, por um tempo determinado, não dispensando a raspagem da superfície do implante, debridamento e desinfecção química (23). De fato, não há base científica que justifique o uso de antibióticos sistêmicos como terapia da doença peri-implantar (23). Apesar de todos os esforços na busca da cura da doença peri-implantar, não há evidências de um tratamento eficaz, pois se trata de uma doença crônica, progressiva e uma das maiores causas para perda de implantes osseointegrados (22, 25).

É necessário desenvolver técnicas que incorporem à estrutura dos implantes e componentes protéticos agentes inibidores da instalação e manutenção do biofilme, que não percam a efetividade decorrente da resistência bacteriana, não esgotem o material no decorrer dos anos e que sejam compatíveis aos tecidos adjacentes.

Agentes antimicrobianos inorgânicos são alternativas de dopagem de biomateriais, porque possuem boa capacidade antibacteriana, excelente biocompatibilidade e estabilidade do material. Outrossim, pesquisas atuais têm voltado suas atenções aos biomateriais que impeçam a adesão do biofilme bacteriano.

As propriedades antibacterianas da prata são conhecidas desde a antiguidade. Uma das primeiras documentações científicas do uso da prata na medicina foi provavelmente em 1881, quando se introduziu o uso de solução de nitrato de prata a 1%, para evitar conjuntivite gonocócica em recém-nascidos segundo Russel e Hugo (1994) apud Chen e

Schluesener (26)¹. Na segunda guerra mundial, os compostos químicos contendo prata foram a principal arma contra infecções. Entretanto, devido a agria, pigmentação irreversível da pele e olhos em consequência da deposição de prata nos tecidos, esta foi abolida como agente antibacteriano (26).

Atualmente, a prata tem sido utilizada na forma de nanopartículas (AgNp) em revestimento de cateteres (27), próteses ortopédicas (28), curativos antimicrobianos para aplicar em feridas (29) entre outros dispositivos. Além disso, há a possibilidade de ampla utilização de nanopartículas de prata, como na indústria têxtil, por exemplo, impregnando tecidos e couro, a fim de prevenir odores e infecções (30), ou até em purificação de água e tratamento de esgotos. (31-32)

Sabe-se que AgNp possui amplo espectro de ação, de maneira a afetar o metabolismo de microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos, inclusive alguns resistentes a drogas, em concentrações muito baixas (33-34). Ela é capaz de inibir a aderência bacteriana (35), possui efeito antibacteriano de longa duração, pois apresenta menor propensão ao desenvolvimento de resistência bacteriana (36) e é um material estável, passível de ser utilizado para revestir diversos biomateriais, inclusive metais (37).

O número de trabalhos sobre os efeitos tóxicos das AgNp vem aumentando rapidamente, mas não há um consenso a respeito do assunto, principalmente pela ausência de homogeneidade entre as metodologias e materiais usados nos experimentos. O que tem sido observado são células bacterianas (procarióticas) e de mamíferos (eucarióticas) interagindo de forma diferente com os mesmos materiais, de modo a resultar em maior compatibilidade das AgNp frente às células eucarióticas (38-39). Ao contrário do que ocorre com as bactérias, há muitos registros na literatura de compatibilidade de AgNp frente a células e tecidos de mamíferos, levando os autores a proporem algumas teorias a respeito, mas este é um campo a ser investigado.

A possibilidade de aproveitar as características antimicrobianas da prata direcionou este estudo para avaliar um biomaterial antibacteriano a ser aplicado sobre implantes endósseos e seus componentes transmucosos, lançando mão de recursos da nanotecnologia. O objetivo é promover uma superfície, em implantes e componentes protéticos transmucosos, capaz de prevenir a adesão e manutenção do biofilme peri-

¹ Russell AD, Hugo WB. Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem.* 1994;31:351-70. Review

implanto patogênico, associada à vantagem de oferecer uma maior segurança e menor toxicidade para o organismo do paciente, de tal modo a evitar irritações, reações alérgicas ou prejuízo à osseointegração.

A hipótese a ser testada é a de que discos confeccionados com titânio comercialmente puro, incorporados a filmes nanoestruturados contendo partículas de prata, possuam biocompatibilidade através da adesão e fixação de osteoblastos em cultura de células.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A Reabilitação com próteses sobre implantes endósseos tem sido uma opção de tratamento amplamente aceita na prática odontológica. Todavia, para que ocorra sucesso de longo prazo, é importante que haja uma integração aos tecidos moles e duros. A fixação de implantes dentários de titânio baseia-se no processo de osseointegração ou “anquilose funcional” (40-41). Os pré-requisitos da osseointegração incluem um mínimo trauma cirúrgico; estabilidade primária do implante, além da ausência de infecção e micro movimentações durante o processo de reparação (42). Somente com a manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares, garantir-se-á sobrevivência e funcionalidade do tratamento.

2.1 OS TECIDOS PERI-IMPLANTARES

Logo após a inserção do implante, uma série de alterações morfológicas nos tecidos peri-implantares são desencadeadas, culminando na formação de estruturas complexas, as quais estabelecem a integração e a homeostase tecidual (42-43).

Um estudo conduzido por Berglundh et al. (42) investigou as fases da reparação óssea envolvidas no processo de osseointegração do implante. Após uma semana da implantação dos parafusos de titânio no sítio ósseo, os autores observaram a formação de matriz provisória, osso imaturo em contato direto com sua superfície e uma forte presença de osteoblastos e osteócitos. Entre oito e doze semanas, houve a remodelação óssea e formação de osso maduro em contato com a superfície. Concluiu-se que a osseointegração representa um processo dinâmico, durante seu estabelecimento e manutenção, com um forte indicativo de que o aumento da superfície de contato do implante com o osso favorece a diminuição desse período (42).

Também relacionados ao complexo implante-componente protético estão os tecidos moles, compreendendo epitélio sulcular, epitélio juncional e tecido conjuntivo de sustentação (43), ou inserção conjuntiva, que se estende até a crista alveolar. Essas estruturas compõem o Espaço Biológico, cuja dimensão equivale a 3,8 mm (44-45). Após a

instalação do componente transmucoso sobre a plataforma do implante, ocorrem adaptações da mucosa peri-implantar, de sorte a promover a formação de uma primeira barreira contra a invasão bacteriana presente na cavidade oral, atingindo suas características finais após seis semanas (43). Desde que haja um controle efetivo do biofilme bacteriano, a vedação estabelecida pelos tecidos moles, ao redor do sistema implante-componente protético, pode ser considerada satisfatória, na promoção de uma proteção mucosa contra a infiltração de agentes patogênicos (43).

2.2 CONTAMINAÇÃO DO IMPLANTE

Os implantes dentários possuem boa previsibilidade com índices de sucesso entre 91 a 99% na mandíbula e de 76 a 81% na maxila, em pacientes desdentados totais (1, 3). Mais recentemente, com o desenvolvimento de técnicas que aprimoraram a osseointegração, os índices de sucesso dos implantes chegaram de 92,9 a 98%, antes da instalação das próteses, ou seja, antes de serem colocados em função (46-47). Generalizando, as falhas ocorrem entre 2% a 7% dos implantes instalados e apenas uma parcela decorre de infecções.

As complicações biológicas, entre elas as desencadeadas por infecções peri-implantares, ocorrem em cerca de 17% dos implantes dentários (48), sendo que podem se dividir entre precoces e tardias. Esposito et al. (49) realizaram meta-análise a partir de um levantamento de 73 estudos. Dos 2.812 implantes, as falhas relacionadas a complicações biológicas ocorreram em 7,7% dos casos. Na área médica, mais precisamente em implantes ortopédicos, as infecções peri-protético articulares representam uma das principais causas de cirurgia de revisão, sendo 11,4% em quadril, com substituição completa da prótese em 86% dos casos (50).

Um levantamento retrospectivo dos índices de complicações trans e pós-operatórias em pacientes submetidos à instalação de implantes dentários osseointegráveis, por um período de 7 anos, realizado por Nóia et al. (51), registrou que entre os 572 prontuários examinados, 9,75% dos indivíduos apresentaram complicações pós-operatórias, sendo que, neste grupo, a presença de infecção nas regiões dos implantes foi a mais frequente (36,75%).

O estresse do ato cirúrgico pode estar relacionado ao agravamento do risco de contaminação. Smith et al. (52) associaram o aumento do número de implantes dentários colocados em um mesmo ato cirúrgico e a elevação do risco de falha precoce, sugerindo que a colocação de implantes múltiplos é capaz de acarretar em aumento do tempo operatório e maior risco de contaminação bacteriana.

Um estudo desenvolvido por Nelson e Thomas (53), com análises microbiológicas de osso, sangue e fluídos teciduais, em alvéolos pré e pós-implantação, verificou que as bactérias podem persistir como um contaminante no osso alveolar, aparentemente reparado, após a extração de dentes comprometidos por patologias apicais ou radiculares. Dos 16 alvéolos de extração dentária, 69% das amostras apresentaram resultados positivos para a presença de bactérias. Após um período mínimo de 3 meses, para reparação óssea pós exodontia, foram instalados implantes e, das 56 osteotomias, 21% revelaram cultura bacteriana positiva. Nos cinco implantes de dois estágios que falharam, foram identificadas bactérias e, ao comparar as radiografias pré e pós implante, evidenciou-se que todos possuíam a extremidade apical próxima à região antes ocupada pela raiz dentária. Ainda, houve uma significativa diminuição na quantidade de espécies bacterianas isoladas em alvéolos submetidos ao debridamento, em relação aos que não foram debridados.

Além dos riscos de contaminação precoce, a falha do implante pode ocorrer tardiamente, a qualquer tempo, após a osseointegração e instalação do componente transmucoso. O processo infeccioso peri-implantar desencadeia, primeiramente, uma inflamação, com sangramento à sondagem e restrita aos tecidos moles adjacentes ao implante, denominada mucosite peri-implantar. Da evolução desse quadro decorre a peri-implantite, em que a lesão da mucosa é frequentemente associada à supuração e profundidade à sondagem, sempre acompanhada por diminuição dos níveis ósseos resultante da reabsorção marginal peri-implantar (11). Dados epidemiológicos mais recentes, coletados na literatura por Derks e Tomasi (54), apresentam uma média dos índices de prevalência para mucosite de 43%, com intervalo de confiança (IC) 32-54%, e 22% (IC: 14-30%) para peri-implantite. O progresso destas afecções, sem que haja uma intervenção terapêutica, possivelmente acarreta na perda do implante (22). Simonis et al. (48) realizaram um acompanhamento de longo prazo, de 10 a 16 anos, o qual avaliou sucesso e sobrevida de 131 implantes dentários não submersos, sendo 82,94% a taxa de sobrevida encontrada.

Há uma relação entre o acúmulo de biofilme e o desenvolvimento de processos inflamatórios nos tecidos peri-implantares (55-56), sendo que, em pacientes desdentados parciais, os dentes naturais adjacentes ao implante são a principal fonte de bactérias (16, 57-58).

Quirynen et al. (59) observaram que houve a colonização do componente transmucoso por biofilme maduro, composto por bactérias associadas à periodontite, no interior do sulco peri-implantar, após duas semanas de sua instalação, em pacientes parcialmente edêntulos, que receberam implantes endósseos.

Existem evidências de que quatro bactérias patogênicas periodontais (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) são comumente detectadas em sulco peri-implantar saudável de pacientes parcialmente edêntulos (60), sendo que há um maior nível de bactérias Gram-negativas em regiões peri-implantares que em regiões subgengivais de dentes naturais (56).

Num processo patológico, tanto de periodontite crônica quanto peri-implantite, bactérias anaeróbias Gram-negativas igualmente estão presentes, mas de maneira distinta, incluindo as do complexo vermelho *P. intermedia*, *F. nucleatum* e *C. rectus* (55). Em estágios mais avançados da patologia, onde há profundidade de bolsa à sondagem acima de 6 mm, as bactérias *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* são comumente encontradas (61-63). Porém, em alguns casos de pacientes desdentados totais, a peri-implantite pode também estar associada a um biofilme relacionado ao periodonto saudável (64).

Quando avaliadas as características histológicas dos quadros infecciosos através de biópsias em humanos, observou-se que, nos tecidos circunvizinhos aos implantes, o infiltrado de células inflamatórias se estende do biofilme, presente na superfície do implante, até a crista óssea, sem que exista um encapsulamento por tecido conjuntivo, como ocorre em dentição natural (65).

Indivíduos com histórico de periodontite ou perda dentária decorrente de doença periodontal representam grupo de risco para desenvolver infecções em implantes (6-7, 9). É conhecido que a resposta inflamatória mediata do hospedeiro ao biofilme, em periodonto de indivíduos susceptíveis à doença periodontal, é capaz de destruir tecidos moles e osso (5). Ericsson et al. (66) avaliaram o comportamento dos tecidos peri-implantares por um período de nove meses, em peri-implantite induzida em cães, e constataram que houve reabsorção

de osso marginal, desencadeada pelo processo inflamatório crônico situado na conexão implante-componente protético.

Fatores sistêmicos, como o diabetes mellitus e o hábito do tabagismo, têm um papel de agravante no quadro infeccioso periodontal. Uma meta-análise, efetuada por Khader et al. (67), após analisar dezoito estudos transversais comparativos, três estudos prospectivos de coorte e dados de dois ensaios clínicos, comparando a higiene oral, gengival e condição periodontal entre diabéticos e não diabéticos, concluiu que pacientes portadores de diabetes têm piores condições de higiene oral, maior severidade de gengivite e doença periodontal. Associada a deficiências no sistema imunológico (68), a hiperglicemia, própria do diabetes, representa risco para a instalação e manutenção de infecções peri-implantares precoces ou tardias. A literatura, ainda, abaliza que o tabaco pode dobrar o risco de reabsorção óssea peri-implantar marginal, levando a expor a superfície do implante ao meio bucal, o que pode aumentar a possibilidade de insucesso do implante (8, 69-70). A partir de uma análise sistemática, Strietzel et al. (70) notaram que há risco de complicações inflamatórias, por doença peri-implantar, significativamente maior em fumantes.

Além dos efeitos inerentes ao paciente e ao procedimento cirúrgico, os sistemas de implantes, com seus diferentes tipos de assentamento protético e características de superfícies, favorecem a adesão de microrganismos em sua superfície. (71-72). Em sistemas de implantes de duas peças é inevitável que se forme uma lacuna, inferior a 10 μ m, denominada microfenda, na junção da plataforma do implante com o componente protético, independentemente do sistema utilizado (73-74). A microfenda possibilita a formação de um nicho para a instalação e colonização bacteriana na interface presente entre osso, implante e componente protético transmucoso (75-76). A infiltração de microrganismos para o interior da microfenda ocorre em qualquer tipo de conexão (72, 77). Consequentemente à presença dos agentes microbianos, um infiltrado inflamatório crônico se estabelece nos tecidos vizinhos à conexão (78), independentemente do controle minucioso de placa e da saúde clínica dos tecidos moles peri-implantares (66).

Outro desafio a ser transposto, o qual influencia na instalação e manutenção de infecções implantares, são as rugosidades induzidas nas superfícies dos implantes. As técnicas de tratamento de superfície objetivam favorecer a cicatrização precoce dos tecidos ao redor do implante, influenciando na fixação, orientação, proliferação e metabolismo de células epiteliais e do tecido conjuntivo, além de proporcionarem condições que acelerem a

osseointegração (79-82). Por outro lado, essas mesmas superfícies rugosas favorecem a progressão natural da doença peri-implantar, quando instalada e não tratada (83).

Berglundh et al. (83), em um estudo comparativo realizado em cachorro, demonstraram que, após a remoção da ligadura indutora da peri-implantite, houve uma evolução da doença peri-implantar mais acentuada em implantes de superfícies moderadamente rugosas que em superfícies lisas. O exame histológico revelou que tanto a perda óssea quanto o tamanho da lesão inflamatória no tecido conjuntivo se apresentaram maiores nos implantes de superfície jateada com areia e ataque ácido (SLA) que nos implantes de superfície polida, e ainda com maior acúmulo de placa bacteriana (83).

Ao se instalar a peri-implantite, não existe evidência que sugira um tipo de tratamento mais eficaz. Estudos, que acompanharam pacientes com peri-implantite por mais de 1 ano, detectaram recidivas após o tratamento em 100% dos casos, sugerindo que os procedimentos devem ser repetidos (19). Quanto ao uso de antibióticos, sistêmicos ou em dispositivos de liberação local controlada, não há evidências científicas que recomendem o uso para o tratamento de doença peri-implantar, sendo apenas indicado como terapia adjunta ao tratamento clínico de debridamento mecânico e desinfecção química com agentes antimicrobianos, em bolsas peri-implantares de profundidade moderada (22-23).

Uma vez que a superfície do implante tenha sido exposta ao meio bucal e colonizada por microrganismos peri-implanto patogênicos, torna-se muito difícil a descontaminação (20), até em decorrência da topografia rugosa promovida pelas espiras do parafuso e pelo tratamento de superfície. Diante de um prognóstico desfavorável, diretamente proporcional à dimensão da reabsorção óssea (19), sem evidências clínicas na literatura de que possa ocorrer uma “reosseointegração” (20), a prevenção da doença parece ser o melhor caminho (23).

2.3 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DA PRATA E SUA BIOCOMPATIBILIDADE

Muito se tem buscado para encontrar soluções em materiais que impeçam a contaminação dos implantes e infecções peri-implantares. As pesquisas atuais se esforçam no sentido de desenvolver um material que consiga promover a integração dos implantes

aos tecidos adjacentes, concomitante à supressão da colonização por espécies bacterianas (34-35, 39, 84).

Inúmeros modelos de ação têm sido propostos, com a função de interferir na adesão bacteriana, tais como a alteração da energia de superfície, ou modelos que utilizam moléculas de liberação controlada de antibióticos e de íons metálicos, os quais garantem atividade bactericida (24).

Agentes antimicrobianos inorgânicos, como o zinco, prata e cobre, são alternativas de dopagem de biomateriais, por possuírem muitas vantagens, como boa capacidade antibacteriana, excelente biocompatibilidade e estabilidade satisfatória (85).

Vargas-Reus et al. (86) compararam as atividades bactericidas e bacteriostáticas de diversos metais nanoparticulados, entre 10 e 50nm, em suspensão, contra *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*. Os autores verificaram que a prata (Ag) apresentou maior eficiência, seguida pela associação de Ag com óxido de cobre (AgCuO), óxido cuproso (Cu₂O), associação Ag com óxido de zinco (AgZnO), somente óxido de zinco (ZnO) e, finalmente, dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de tungstênio (WO₃). Entretanto, estes dois últimos apresentaram pouca ou nenhuma ação antibacteriana.

Acredita-se que nanopartículas metálicas exerçam seus efeitos antimicrobianos através de uma variedade de mecanismos. Morones et al. (87) propôs um modelo de experimento buscando conhecer a ação de AgNp contra bactérias Gram-negativas e verificou que são basicamente três os mecanismos. AgNp, com tamanhos inferiores a 10 nm, aderem-se à superfície da membrana celular e perturbam drasticamente funções, tais como a respiração e a permeabilidade, impedindo a regulação do transporte celular através da membrana, acarretando em vazamento de componentes intracelulares e morte. Essas mesmas AgNp são capazes de penetrar no interior das bactérias e interagirem com compostos sulfurados e contendo fósforo, tais como DNA, intensificando os danos. Finalmente, elas liberam íons de prata (Ag⁺), aprimorando o seu efeito bactericida. Partículas menores liberam mais íons que as maiores, sendo que a maior biodisponibilidade de Ag⁺ ocorre em AgNp com 10 nm (39). Os íons de Ag (Ag⁺) e de outros metais, que vêm a ser liberados por nanopartículas, são capazes de interagir com os grupos tiol (sulfidril), levando à inativação de proteínas e enzimas da cadeia respiratória, comprometimento da produção de adenosina trifosfato (ATP) e morte celular (37). Somente as nanopartículas livres, sem estarem aderidas a uma matriz, exercem esses efeitos bactericidas (87).

Através de um modelo, utilizando uma membrana impregnada por AgNp, Dror-Ehre et al. (35), evidenciaram que revestimentos de prata podem inibir a fixação inicial e crescimento bacterianos, retardando, dessa maneira, a formação de biofilmes. Porém, não está claro qual foi o mecanismo que levou a isso. Todavia, os autores sugerem que o processo pode estar relacionado à interrupção de funcionamento da célula microbiana, resultando na interrupção da primeira ligação das bactérias ao substrato, que é fraca e transitória, ou da segunda fase de fixação, em que ocorre a ancoragem irreversível.

O número total de células bacterianas, vivas e mortas, encontradas em superfícies de dióxido de titânio (TiO_2) com agregados de AgNp, pode chegar a apenas 20% das ligadas à superfície TiO_2 de controle, sem revestimento (88). Em um experimento *in vitro*, realizado por Liao et al. (84), após 24 horas de incubação, superfícies de Ti associadas a AgNp (Ti-AgNp) foram capazes de inibir até 94,79% das bactérias *A. actinomicetemcomitans* e 93% das *P. gingivalis*. Paralelamente, estas superfícies de Ti-AgNp ofereceram compatibilidade à cultura de fibroblastos, permitindo a formação de contatos célula-célula e ligações com a superfície do substrato, após 12 horas de incubação.

Contrariamente, alguns autores detectaram efeitos tóxicos das AgNp sobre as células eucarióticas. Zhang et al. (89) realizaram um levantamento na literatura, concernente à citotoxicidade das AgNp, e verificaram que, entre os resultados dos estudos documentados, ficou claro que tanto as AgNp livres quanto Ag^+ , ou ambos agindo em sinergismo, contribuem para promoção de estresse oxidativo celular em seus diferentes níveis, tais como: membrana, moléculas e organelas, incluindo mitocôndrias, lisossomas e núcleo, o que pode levar à apoptose ou necrose (89). Vários fatores, como dose, tempo de exposição, tamanho, forma, química de superfície e tipos de células expostas influenciam nos efeitos das AgNp (89). Na maioria das células, a absorção de AgNp é um processo tempo-dose dependente (34). A toxicidade das AgNp de 20 a 80 nm está estritamente relacionada à dissolução de íons Ag^+ , ao passo que AgNp com tamanhos iguais ou inferiores a 10 nm interagem diretamente com as superfícies celulares ou em seu interior (39). Após a internalização, dependendo do tamanho e da forma das AgNp, elas se alojam nas mitocôndrias e núcleo, induzindo uma série de efeitos, incluindo inibição da síntese de ATP, estresse oxidativo, comprometimento da membrana celular, pausa do ciclo celular, respostas inflamatórias, danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e genotoxicidade, aberração cromossômica e apoptose (89-90).

2.4 REVESTIMENTOS NANOESTRUTURADOS

As nanopartículas de prata conseguem conservar suas propriedades antibacterianas mesmo quando incluídas em revestimentos (88, 91). O modo de ação antibacteriana dos revestimentos não está completamente elucidado. Algumas hipóteses relacionadas às propriedades antiaderentes e galvânicas das superfícies têm sido relatadas, independentemente da liberação de Ag^+ ou de AgNp (35).

Revestimentos nanoestruturados, com espessura inferior a 100 nm, têm demonstrado efeitos favoráveis em estudos com cultivo de células ósseas, como melhoria da aderência celular, maior grau de células diferenciadas e de mineralização óssea (92-94), o que confere características de biocompatibilidade. Biomateriais que promovem a adesão celular e regeneração de tecidos em contato íntimo com a superfície dos implantes oferecem uma boa estratégia para evitar a formação de biofilme sobre o implante, decorrente da redução da superfície disponível para a adesão microbiana e colonização primária (95).

Gristina (95) propôs a teoria da “corrida pela superfície”, que descreve a competição entre bactérias e células teciduais em aderir à superfície do implante. O autor sugere que as propriedades adesivas dos biomateriais promovem integração dos substratos às células ou bactérias de maneiras semelhantes, ou seja, apresentam sítios receptores potenciais para ambos. Após a inserção do implante, os primeiros elementos que alcançarem esses sítios disponíveis na superfície, serão os colonizadores. Uma vez que as células teciduais tenham colonizado primeiro a superfície, com uma ligação segura e bem estabelecida, quando outros elementos, como bactérias, chegarem subsequentemente, serão confrontados por células vivas do hospedeiro, e aquela superfície estará resistente à colonização bacteriana. O oposto pode ser verdadeiro, pois as bactérias podem derrotar as células do hospedeiro, na “corrida pela superfície”, e causar infecção ao invés da integração do tecido. O estabelecimento da adesão bacteriana impede que as células teciduais desloquem esses colonizadores primários e se integrem à superfície do biomaterial.

A busca pelo desenvolvimento de biomateriais modificados, que aprimorem a compatibilidade e integração de tecidos, ao mesmo tempo em que acarretem resistência à

colonização microbiana na “corrida pela superfície” (95), é uma possibilidade plausível para o controle bacteriano em implantes. A alteração topográfica na superfície do implante, oferecida pela nanoestrutura de um revestimento, demonstrou-se eficaz no aprimoramento da adesão celular e regeneração tecidual pós-cirúrgica, conforme descrito por Svensson et al. (85), em experimento com implantes, realizado em ratos. Nesse estudo, utilizaram-se revestimentos de metal nobre, compostos por ouro, prata e paládio, os quais promoveram um alto grau de contato osso-implante e uma quantidade de regeneração óssea similares às superfícies de implantes de titânio puro (Ti), sem revestimento e usinadas. Os autores também registraram, nos testes microbiológicos, 99% de inibição da adesão de *S. aureus* às superfícies revestidas, em comparação aos implantes de Ti não revestidos (85). De fato, quando o revestimento nanoestruturado está associado a metais nobres, como ouro, prata ou paládio, agrega-se uma característica antimicrobiana, capaz de reduzir a taxa de infecção tecidual em aproximadamente 40-50%, segundo conclusões de Goldschmidt et al. (1995) e Gosheger et al. (2004) apud Svensson et al (85) ². Além disso, um estudo laboratorial realizado em ratos, por Suska et al. (96), o qual avaliou dispositivos de silicone cobertos com filme nanoestruturado de Ag, sugeriu uma ótima capacidade de modular a inflamação nos tecidos moles, demonstrando uma redução do número de células no exsudato inflamatório, em comparação com o controle, com predominância de macrófagos e redução dos neutrófilos.

Embora a ação dos biomateriais revestidos com associações de Ag ainda não seja totalmente compreendida, há evidências de que esses revestimentos possam ser promissores em superfícies de implantes de Ti e seus componentes protéticos, porque discos de Ti revestidos com AgNp apresentaram boa propriedade antiadesiva bacteriana quando comparados com discos de Ti polidos (84).

“Bactérias são organismos antigos e altamente adaptáveis, ao passo que os biomateriais são novos, mas imitam o substrato básico para as bactérias, as quais já evoluíram nos processos de colonização e estratégias de sobrevivência em superfícies” (95, p.12, tradução nossa). Por isso, é necessário buscar estratégias no aprimoramento das

² Goldschmidt H, Hahn U, Salwender HJ, Haas R, Jansen B, Wolbring P et al. Prevention of catheter-related infections by silver coated central venous catheters in oncological patients. Zentralbl Bakteriол. 1995 Dec;283(2):215-23

Gosheger G, Hardes J, Ahrens H, Streitburger A, Buerger H, Erren M et al. Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model--an analysis of the infection rate and toxicological side effects. Biomaterials. 2004 Nov;25(24):5547-56

características dos implantes e componentes protéticos transmucosos, conferindo propriedades inibidoras da adesão bacteriana, sem danificar a biocompatibilidade aos tecidos hospedeiros, de modo a favorecer a rápida integração das superfícies e manutenção da homeostase, barreiras essenciais na corrida contra as infecções peri-implantares.

2.5 TÉCNICAS DE DEPOSIÇÃO DE FILMES NANOESTRUTURADOS

Filmes finos são constituídos por camadas de material, com espessura abaixo de 1 μ m, suportadas por um substrato. Já existem algumas tecnologias para a fabricação de filmes finos, classificados através de métodos físicos ou químicos de deposição, em nanoescala.

No processo de deposição por solução química, utilizam-se principalmente duas técnicas de deposição: spin-coating e dip-coating. Estas técnicas envolvem deposição em fase líquida, geralmente com a dissolução de um precursor em um solvente adequado, seguida de sua deposição na superfície de um substrato e subsequente evaporação controlada do solvente e/ou tratamento térmico.

As descrições das técnicas, a seguir, baseiam-se no livro “Phisic of Thin Films”, do capítulo escrito por Schroeder (97). A técnica de spin-coating consiste em gotejar a solução sobre o substrato e submeter a uma rotação controlada, de forma a espalhar homogeneamente a solução por toda a superfície. Neste processo são controlados a velocidade e o tempo de deposição da resina. Todavia, esse método apresenta um custo maior e não é tão utilizado na indústria. No entanto, o processo de dip-coating é uma das técnicas mais difundidas e utilizadas para a deposição de filmes finos, a partir de precursores em fase líquida, em revestimentos de grandes áreas superficiais, sendo esse fato importante para aplicações industriais (41). Com a escolha de uma viscosidade da solução apropriada, em condições de temperatura e velocidade controladas, é possível variar a espessura do revestimento com alta precisão (98). Ademais, o tratamento térmico proporciona algumas características desejáveis ao revestimento produzido. Quanto maior for a temperatura a qual o filme é submetido, no tratamento térmico, mais resistente será a ligação com o substrato. O TiO₂, por exemplo, possui resistência contra água e ácidos, exceto ao ácido sulfúrico. Quando filmes, insolúveis em ácidos e álcalis, são tratados termicamente a mais de

250°C, só conseguem ser removidos por meio de polimento. Neste processo de formação dos filmes TiO_2 e SiO_2 , há um forte entrelaçamento estrutural por pontes de oxigênio, durante a formação de película (97).

Na técnica de dip-coating, o substrato é imerso perpendicularmente a uma solução coloidal, com velocidade constante, por meio de um equipamento com alta estabilidade, controle fino da velocidade e livre de vibrações ou interferências externas, de modo a garantir a deposição de um filme homogêneo. Isso significa que, para se obter filmes de qualidade, além das características do substrato e da solução precursora (solvente, concentração, viscosidade, tipo de precursor, etc.), é necessária a utilização de um equipamento que promova a inserção e a retirada do substrato com alta estabilidade, controle fino da velocidade e livre de vibrações (97). Após manter o substrato por algum tempo no interior da solução, o equipamento o retira, com a mesma orientação e cuidados com que foi imerso. Uma camada fina, então, fica depositada sobre o substrato, na medida em que este é puxado, e o excesso de líquido escorre a partir da superfície. Em seguida à deposição da solução coloidal, as peças são colocadas em estufa a uma temperatura pré-determinada, para a evaporação parcial do solvente, formando um filme fino. Esses passos são repetidos, num processo contínuo, sucedendo-se um após o outro para a aposição das camadas. Posterior ao processo de secagem, é feito um tratamento térmico, para promover a desidratação da resina, resultando em um filme (97).

2.6 CULTURA CELULAR

O desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos e estabelecimento de linhagens celulares é indispensável para a pesquisa há várias décadas (62). As culturas celulares primárias são provenientes de tecidos explantados de um doador e possuem um número de passagens limitado.

[...] esse limite é determinado pelo número de duplicações que a população celular atinge até que cessem de crescer, devido ao fenômeno da senescência. Esse fenômeno é determinado por fatores intrínsecos que regulam o ciclo celular [...] e é acompanhado pelo encurtamento dos telômeros nos cromossomos. Quando estes atingem um

comprimento mínimo, a célula não consegue mais se dividir. O que mantém o comprimento do telômero é a telomerase, infra regulada na maioria das células normais [...] (99,p.12, tradução nossa).

Em células germinativas e células tronco, a telomerase é supra regulada, por isso, ocorrem inúmeras duplicações, sem que haja senescência. Para que uma célula comum se torne imortal, insere-se o gene da telomerase hTERT em seu material genético (99). Esse é o princípio das linhagens celulares immortalizadas.

A aceitação de linhagens celulares como modelo para a função biológica varia entre os campos de pesquisa (100-101). Contudo, estudos biológicos que abordam atividades celulares básicas, como o ciclo celular, são rotineiramente realizados em linhagens celulares (38, 102-103). Estas culturas celulares são fáceis de manter e são preferidas na maioria dos estudos de toxicidade, para reproduzir melhor os dados. Portanto, é extremamente importante que os estudos *in vitro* selecionem tipos celulares capazes de representar melhor o tecido alvo.

Durante o tratamento com implantes, duas categorias de células estão intimamente ligadas à integração e ao processo de reparação: fibroblastos e osteoblastos. Os fibroblastos, principais células relacionadas à produção de matriz extracelular (104), são provenientes da mucosa bucal e atuam no processo de reparação tecidual. Osteoblastos, por sua vez, são os formadores de matriz óssea (104), responsável pela osseointegração do implante (42).

Ao estudar a biocompatibilidade de biomateriais é imprescindível uma maior acuidade na mensuração dos índices. A linhagem immortalizada de osteoblastos oriundos de ratos demonstrou ser o tipo celular mais sensível, quando comparada às respostas das células humanas em testes laboratoriais (105), sugerindo ser um sistema de modelo *in vitro* para o rastreio da biocompatibilidade.

Tem sido demonstrado que diversas células devem estar ligadas a superfícies para que possam sobreviver e se proliferarem, conhecido como dependência de ancoragem (106). A maioria das células de mamíferos se adere e espalha sobre uma matriz subjacente, a fim de realizar seu metabolismo, proliferação e diferenciação. A matriz biológica, que desenvolve esse papel, é denominada matriz extracelular (MEC) (107). A sua função primária é mediar a adesão celular (108), pois, quando isso não acontece, as células, em geral, iniciam um processo de apoptose (99).

Usualmente, a adesão celular à MEC é mediada por uma classe de receptores da superfície celular conhecidos como integrinas (109), as quais, igualmente, estão envolvidas na regulação do comportamento celular, incluindo migração, proliferação e diferenciação. Os osteoblastos sintetizam proteínas envolvidas no processo de adesão celular, tais como fibronectinas e osteopontinas, que por sua vez possuem propriedades adesivas ou quimiotáticas, principalmente por conterem a sequência tripeptídica ácido arginil glicil aspártico (Arg-Gli-Asp), específica para a fixação das integrinas. Esta integração promove a efetivação da adesão e crescimento celular (110).

Pierres et al. (106), em uma revisão de literatura, objetivando atualizar os conhecimentos sobre a regulação do assentamento celular a superfícies adesivas, descreveram as alterações morfológicas celulares durante o processo de fixação e adesão a uma superfície, dividindo em etapas a formação e extensão do contato celular com um substrato. Foi definido que “espalhar” refere-se à célula ativa se espalhando no substrato, ao passo que “achatamento” designa a deformação micrométrica, e “alinhamento”, uma aposição sub nanométrica das membranas celulares às superfícies adesivas. Tanto o achatamento quanto o alinhamento são parte do processo de adaptação, em que o contato é limitado e as células se mantêm num formato arredondado (106). Numa primeira fase, as ligações são muito fracas e podem se romper facilmente em poucos segundos. Para que esse contato seja fortalecido, são necessários pontos de contato adicionais, promovidos pelo achatamento celular e pelo alinhamento, proporcionando o assentamento da membrana à superfície (106). No achatamento, há um ligeiro aumento do diâmetro, semelhante ao achatamento de uma gota de água em uma superfície. O alinhamento celular à superfície de contato é necessário para permitir a formação das ligações moleculares, através de receptores de adesão, originando uma adesão bastante robusta (106). Finalmente, a célula começa a desenvolver maiores alterações morfológicas, com polarização e emissão de prolongamentos (lamelipódios), resultando em aumento da área de contato, podendo ocorrer durante dezenas de minutos, horas ou, até mesmo, dias após o contato (106). Lamelipódios são projeções citoplasmáticas por meio das quais a célula se movimenta no substrato ou na MEC, enquanto que a prospecção do ambiente ao seu redor é efetuada por emissões de prolongamentos citoplasmáticos curtos, em forma de dedos, chamados filopódios (104).

Para detecção, *in vitro*, da citotoxicidade, proliferação ou ativação celular, um teste bastante sensível é o ensaio colorimétrico com base no sal tetrazolium MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil), o qual mensura apenas a quantidade de células vivas e pode ser lido em um espectrofotômetro de poços múltiplos (leitor de ELISA), com elevado grau de precisão (111). O anel tetrazolium do MTT é quebrado nas mitocôndrias ativas, e assim a reação ocorre apenas na presença de viabilidade celular. A absorbância registrada na leitura é diretamente proporcional ao número de células ativas, por produzirem mais formazan que do que as células em repouso. A clivagem do formazan ocorre mesmo na ausência de proliferação celular (87), por ser gerada apenas pela mitocôndria ativa, independentemente da produção de DNA (112).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste experimento foi verificar a biocompatibilidade de três diferentes filmes nanoestruturados associados à Ag sobre superfície de Ti, através de teste de toxicidade direta em cultura de osteoblastos de linhagem imortalizada (MC3T3-E1) e observação da morfologia e adesão celular em MEV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todo o experimento se baseou na utilização de amostras compostas por um substrato de Ti comercialmente puro, que é largamente utilizado na indústria para fabricação de implantes e componentes protéticos, divididas em dois grupos: teste e controle. Para avaliar a compatibilidade dos filmes nanoestruturados, efetuou-se teste de citotoxicidade direta (MTT) seguido de observação da morfologia e adesão celular em MEV, utilizando linhagem imortalizada de osteoblastos de camundongos (MC3T3-E1). O preparo da cultura, bem como a realização do ensaio MTT, foram realizados em capela de fluxo laminar, para manter a esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas, no Laboratório de Cultivo Celular do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). A observação das amostras em MEV deu-se no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO) da FOUSP.

4.1 AMOSTRAS

Foram confeccionados discos de titânio comercialmente puro, usinados da mesma forma que os componentes protéticos da marca Pross® (Dabi Atlante), com diâmetro de 5,9 mm, os quais serviram de substrato para aplicação das nanoestruturas. As amostras foram submetidas ao mesmo polimento industrial utilizado nas peças prontas, encontradas na indústria: primeiramente em roda de sebo e, depois, por uma roda de lona com massa marrom número um.

Após o polimento, as amostras foram divididas em grupos teste, sobre os quais foram depositados os filmes nanoestruturados, e controle:

- A. Grupos teste: Filmes nanoestruturados denominados de acordo com sua composição:
 - 1. SiO₂: Substrato de Ti, com deposição de solução coloidal de prata e sílica, conhecido comercialmente por Nanox Clean® R02;

2. TiAg: Substrato de Ti, com deposição de solução coloidal hidrotermalizada de prata e dióxido de titânio, conhecido comercialmente por Nanox Clean® TiAg;
 3. TiAA: Substrato de Ti, com deposição de solução hidrotermalizada de TiO_2 , conhecido comercialmente por Nanox Clean® TiAA.
- B. Grupo controle Ti: Substrato de Ti, sem deposição de filme na superfície. Trata-se de um material padrão ouro na implantodontia e reconhecidamente compatível com tecidos ósseos.

Os filmes nanoestruturados deste experimento foram desenvolvidos e aplicados pela indústria NANOX® tecnologia (São Carlos, SP-Brasil). Os discos, reservados para comporem as amostras do grupo teste, receberam três camadas de aplicação dos filmes nanoestruturados (SiO_2 , TiAg e TiAA), através do método de deposição por imersão (dip-coating), esquematizado na figura 4.1.

Figura 4.1-Esquema de deposição por dip-coating

Ao final do processo de deposição, a realização de um tratamento térmico em estufa a 120°C promoveu uma densificação da solução coloidal depositada, resultando em três camadas firmemente estáveis e aderidas à superfície dos substratos de titânio. O TiO_2 da superfície do substrato possui H ou OH, que foi eliminado durante o tratamento, sucedendo uma ligação química (Ti-O-Composto) com o composto (SiO_2 e TiO_2) respectivo às associações empregadas (SiO_2 , TiAA e TiAg). As aplicações dos filmes não resultaram em alta taxa de deposição, mas deposições em “ilhas”, sobre o substrato de titânio (informação pessoal).³

³ Daniel Minozzi – Nanox tecnologia S/A. Mensagem recebida por chriskassab@usp.br em 10 fev. 2015.

A composição química das soluções coloidais e concentrações dos materiais, em seus respectivos meios, estão discriminados no quadro 4.1.

Solução coloidal	Sistema químico	Concentração em PPM (partícula do ativo)	Concentração do ativo em mg/m² com três camadas de aplicação (partícula do ativo)	Tamanho médio da partícula do ativo	Meio/ solvente
SiO ₂ (prata-dióxido de sílica)	Ag SiO ₂	108 (Ag)	53,98 (Ag)	200 nm	Água
TiAg (prata-titânio)	Ag TiO ₂	540 (TiO ₂) 38 (Ag)	269,88 (TiO ₂) 18,80 (Ag)	1 µm (TiO ₂) 7 nm (Ag)	Etanol
TiAA (dióxido de titânio)	TiO ₂	81 (TiO ₂)	40,92 (TiO ₂)	1 µm (TiO ₂)	Metanol e acetona

Quadro 4.1-Composição do meio/solvente e sistema químico, de cada solução coloidal, e composição, concentração e tamanho das partículas ativas, Ag ou TiO₂, associadas às nanoestruturas

Cada química utilizada gerou uma estrutura morfológica única para as deposições. Com a finalidade de realizar a caracterização microestrutural das superfícies, após a deposição de três camadas em substrato de titânio comercialmente puro, as amostras teste TiAg, TiAA e SiO₂ e o controle Ti foram analisadas por imagem em MEV – Microscópio MEV-FEG-VP Zeiss Supra 35 e DRX, com diferentes aproximações (figura 4.2 a 4.5), e submetidas a uma análise química por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX) (Figuras 4.6 a 4.9).

Imagens geradas em MEV-FEG (figura 4.2 à figura 4.4) permitiram observar as diferenças de superfícies e a formação dos materiais propostos pelas sínteses e deposição dos materiais. As superfícies lisas adquiriram topografias distintas, com a aplicação das nanoestruturas, sendo que houve um gradativo aumento na rugosidade da composição SiO₂ para TiAA e TiAg (figura 4.2). As amostras Ti e SiO₂ apresentaram topografia com estrias suaves e paralelas, decorrentes do processo de usinagem. TiAA e TiAg apresentaram maior rugosidade, com elevações mais acentuadas e presença de sulcos profundos na amostra TiAg (figura 4.3).

Figura 4.2-Imagem em MEV-FEG das superfícies: Substrato em titânio sem deposição (Ti) e com deposição das soluções coloidais SiO₂, TiAA e TiAg. Aumento original de 1.000X

Figura 4.3-Detalhamento, por MEG-FEG, das superfícies de cada amostra Ti, SiO₂, TiAA e TiAg. Aumento original de 30.000X

Para uma melhor visualização das diferenças morfológicas em cada superfície nanoestruturada, foram usadas magnitudes diferentes no MEV-FEG (figuras 4.4 e 4.5), devido a uma distinção nos tamanhos das partículas ativas (Ag e TiO₂) em cada preparação, conforme elucidado anteriormente (quadro 4.1).

Figura 4.4-Detalhamento, por MEV-FEG, da deposição das partículas dos ativos nas superfícies SiO_2 e TiAA: SiO_2 exibe a deposição de partículas de sílica (mais escura) e, logo acima, Ag (mais clara); TiAA apresenta partículas de TiO_2 . Aumento original de 80.000X

Figura 4.5-Imagens, por MEV-FEG, da deposição de partículas do ativo na superfície TiAg, com aumento original de 30.000X; no detalhe, as deposições dos cristais de Ag dispersas. Aumento original de 300.000X

Cada sistema químico utilizado tem sua característica estrutural específica. Nas soluções coloidais que contêm a prata, SiO_2 e TiAg, mesmo que em tamanhos de partículas distintos, 200nm e 7nm respectivamente, a prata se apresenta em fase metálica e possui uma conformação estrutural visivelmente cúbica (figuras 4.4 e 4.5).

A análise química por EDX das amostras destinou-se a verificar a presença dos ativos nas respectivas superfícies Ti, TiAA, TiAg, SiO_2 . Esta é uma técnica que permite identificar os elementos presentes em uma amostra, através de uma análise qualitativa, bem como estabelecer a proporção ou concentração presente na amostra, sem danificá-la.

Figura 4.6-Imagem representativa do resultado da análise química por EDX do substrato em titânio sem deposição (controle Ti)

Figura 4.7-Imagem representativa do resultado da análise química por EDX da amostra de substrato em titânio com deposição da solução coloidal SiO_2

Figura 4.8-Imagem representativa do resultado da análise química por EDX da amostra de substrato em titânio com deposição da solução coloidal TiAA

Figura 4.9-Imagem representativa do resultado da análise química por EDX da amostra de substrato em titânio com deposição da solução coloidal TiAg

Todas as superfícies apresentaram altas concentrações de Ti e presença de oxigênio (figuras 4.6 a 4.9). As superfícies derivadas das soluções coloidais associadas à prata, SiO_2 e TiAg, também registraram presença de Ag (figura 4.7 e 4.9).

4.2 CULTURA CELULAR

A citotoxicidade das superfícies deste estudo foi avaliada frente à cultura de osteoblastos, oriundos de cultura de linhagem imortalizada MC3T3-E1, extraída de calvária de camundongos, e isentos de análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), conforme protocolo CEUA/FOUSP nº 016/2013 (Anexo A).

A cultura foi descongelada e cultivada em placa de Petri com meio de cultura MEM α (Nutricell, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) e 1% de gentamicina (Sigma®).

As células foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂), e o meio de cultura, trocado de 2 a 3 dias. A progressão da cultura foi avaliada por microscopia de fase e, quando a placa de Petri se apresentou saturada de células, foi realizada a tripsinização do meio, com tripsina a 0,25%. Em seguida, uma porção de 100 μ L de meio ressuspendido com as células foi corada com a mesma quantidade (100 μ L) de azul de metileno, para efetuar a contagem das células, com auxílio de uma câmara de Neubauer. Desta forma, pôde-se calcular o volume de meio a ser depositado sobre as amostras.

4.3 TESTE DE TOXICIDADE DIRETA

Para avaliar a citotoxicidade das amostras, foi utilizado um teste colorimétrico quantitativo de sobrevivência e proliferação de células de mamíferos (MTT), o qual utiliza um sal tetrazolium, o (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Esse ensaio é capaz de detectar as células vivas, através do sinal gerado pela ativação das mitocôndrias. Por conseguinte, pode ser utilizado para medir a citotoxicidade, proliferação ou atividade celular (111-112).

Os ensaios foram realizados em placas de poliestireno de 96 poços (Corning®). As células foram depositadas sobre os discos teste com cobertura (SiO₂, TiAg e TiAA) e controle, sem cobertura (Ti), em triplicata, com densidade de 110 células/mm². Para o preparo de amostras de controle de toxicidade negativo (CN), somente com nutrientes, os osteoblastos foram depositados diretamente no interior dos poços, sobre a superfície da

placa de poliestireno e sem presença de amostras, na mesma concentração, igualmente em triplicata. Em seguida, o meio de cultura (MEM α + 10% de SFB + 1% de gentamicina) foi difundido nos poços, sobre as amostras teste e os controles.

As análises se deram após 24, 48 e 72h de armazenamento em estufa, a 37°C, com atmosfera úmida contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂. Transcorridos os tempos experimentais, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com solução tampão phosphate buffered saline (PBS) estéril. Na sequência, foram colocados 5 mg/mL da solução de 100 μ L de meio de cultura com 1 mg/mL de MTT em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C por 3h. Transcorrido esse prazo, adicionou-se 10 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) em temperatura ambiente, mantendo sob vibração por 5 minutos, a fim de promover a dissolução dos cristais de coloração azul/violeta resultantes da clivagem dos anéis de tetrazolium do MTT. Esta clivagem é promovida pela enzima succinato-desidrogenase (SDH), produzida por mitocôndrias ativas (111). Destarte, a solução do MTT, antes, com coloração amarela, na presença da atividade mitocondrial, adquiriu coloração violeta. As soluções foram transferidas para novos poços, sem os discos. Para realizar o controle do branco, como referência para a leitura no espectrofotômetro, três poços foram reservados e preenchidos com água. As placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (ELX 800 – Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instruments, ICC, USA), com comprimento de onda de 540 nm. A partir da graduação colorimétrica representada pelas absorbâncias, após extrair o valor de referência do branco, as aferições foram registradas, possibilitando comparar a viabilidade celular em cada amostra com os controles (CN e Ti).

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A observação em MEV foi realizada para avaliar a morfologia das células e a adesão às superfícies dos discos. As células foram cultivadas em placa de poliestireno de 96 poços (Corning®), sobre as amostras com coberturas (SiO₂, TiAA e TiAg) e sem cobertura (Ti), em duplicata, na densidade de 110 células/mm². Para fazer as amostras de controle da adesão (Lm), as células foram depositadas sobre lamínulas de vidro, em placa de poliestireno de 24 poços (Corning®), em duplicata.

Após 24 horas de armazenamento em estufa, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂, efetuou-se o preparo para análise em MEV. O meio de cultura foi

retirado, os poços lavados em PBS, seguido pela fixação das amostras, com solução 0,1% de glutaraldeído, acrescido de 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M - pH 7,4, por 20 minutos no gelo. Transcorrido esse período, as amostras foram lavadas com tampão de cacodilato de sódio 0,05M – pH 7,4, desidratadas em crescentes diluições de etanóis e, logo após, com adição de hexametildisilizano (HMDS) a 100%, foram secas por uma noite. As amostras foram fixadas em “stubs” de alumínio e metalizadas no aparelho Bal-Tec SCD 050, com uma camada de aproximadamente 25 nm de ouro, para avaliação em microscópio eletrônico de varredura LEO 430, operado com 15 kV.

4.5 METODOLOGIA DE ANÁLISE DE DADOS

A hipótese testada foi de que os discos confeccionados em titânio comercialmente puros e cobertos com nanoestruturas a base de prata coloidal possuem biocompatibilidade com osteoblastos de cultura de linhagem imortalizada. Através da comparação dos resultados obtidos nas leituras resultantes do MTT, pode-se comparar o comportamento das amostras entre si e em relação aos grupos controle (CN e Ti). Além disso, identificaram-se, dentro de cada grupo, as defasagens na progressão da cultura, correspondentes aos tempos experimentais (24h, 48h e 72h). Na comparação entre os grupos, empregou-se o teste de análise de variância ANOVA (113-114). Para isso, em cada comparação, foi verificada a homogeneidade das variâncias entre os grupos. Quando não houve homogeneidade, realizou-se o ajuste, através do teste de Brown-Forsythe.

A fim de identificar os grupos que apresentam diferenças estatísticas entre si, realizaram-se comparações múltiplas, ou seja, de dois a dois, servindo-se do teste de Dunnett, para as variâncias não homogêneas, ou do teste de Bonferroni, nos resultados em que não houve o ajuste de Brown-Forsythe, isto é, com igualdade das variâncias.

Com o intuito de comparar os resultados da progressão da cultura no decorrer dos tempos experimentais, em cada grupo isoladamente, foi empregada a análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas. Trata-se de medidas repetidas, uma vez que as avaliações em diferentes momentos são relativas a uma mesma amostra. Complementando, para identificar quais momentos se diferenciaram entre si, foram realizadas comparações múltiplas, entre cada tempo de dois a dois, utilizando o teste de Bonferroni.

Em todas as comparações, foi considerado um nível de significância de 5%. Desta forma, apreciou-se haver diferença estatística entre os grupos quando o p-valor registrado foi inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

Objetivando facilitar a interpretação e melhor ilustrar os resultados, foram construídos tabelas e gráficos elaborados no Microsoft Excel.

5 RESULTADOS

Após 24 de armazenamento, foi realizada a leitura do ensaio de MTT, assim como a observação das amostras preparadas para MEV. Nos tempos subsequentes, 48h e 72h, deram-se, sucessivamente, somente as leituras do MTT.

5.1 MTT

As leituras dos ensaios de MTT forneceram registros dos valores das absorbâncias obtidos em cada poço de cultura (figura 5.1), já descontado o valor de referência de branco (poço somente com água), e as avaliações estatísticas foram realizadas. Isso possibilitou contemplar a viabilidade das células e comparar a progressão da cultura no decorrer do tempo experimental, de acordo com cada superfície, com e sem cobertura.

Tabela 5.1-Valores das absorbâncias registrados nas leituras dos ensaios de MTT

Tempo de incubação	Grupos	Amostras		
		1	2	3
24h	Ti	0.034	0.053	0.03
	TiAg	0.069	0.043	0.035
	TiAA	0.034	0.032	0.04
	SiO ₂	0.073	0.112	0.144
	CN	0.036	0.04	0.035
48h	Ti	0.142	0.197	0.188
	TiAg	0.156	0.174	0.151
	TiAA	0.192	0.139	0.152
	SiO ₂	0.176	0.21	0.217
	CN	0.071	0.101	0.079
72h	Ti	0.034	0.1	0.137
	TiAg	0.136	0.117	0.111
	TiAA	0.134	0.132	0.13
	SiO ₂	0.079	0.08	0.076
	CN	0.207	0.218	0.219

5.1.1 Progressão da cultura de osteoblastos no grupo Ti

Houve diferença significativa entre os tempos experimentais ($p < 0,05$) (tabela 5.2). Ao avaliar os resultados das comparações múltiplas (tabela 5.3), verificou-se que esta diferença estatística ocorreu apenas entre os tempos experimentais 24h e 48h ($p < 0,05$). Os valores médios das absorbâncias registradas pela leitura em 48h foram significativamente maiores que em 24h e decresceram, sem diferença estatística, em 72h (tabela 5.3 e gráfico 5.1). A progressão da cultura no decorrer dos três tempos experimentais, de 24h para 72h, não apresentou aumento estatisticamente significativo (tabela 5.3).

Tabela 5.2-Resultados referentes às amostras do grupo Ti, relativos às absorbâncias obtidas das leituras do MTT nos três tempos experimentais (24h, 48h e 72h)

Ti	24h	48h	72h
Média	0,039	0,176	0,090
mediana	0,034	0,188	0,100
δ	0,012	0,030	0,052
mínimo	0,030	0,142	0,034
máximo	0,053	0,197	0,137

$p=0,031$

Tabela 5.3-Comparações múltiplas dentro do grupo Ti, entre os tempos experimentais, para determinar a progressão da cultura

Grupo de referência		grupo de comparação	p-valor
24h	vs	48h	0,035
24h	vs	72h	0,718
48h	vs	72h	0,118

Gráfico 5.1-Comparação das médias de absorbâncias nos tempos experimentais, demonstrando a progressão da cultura na amostra Ti

5.1.2 Progressão da cultura de osteoblastos no grupo TiAg

Neste grupo, também foi encontrada diferença significativa entre os tempos experimentais ($p < 0,05$) (tabela 5.4). Os resultados obtidos das comparações múltiplas (tabela 5.5) registraram que houve diferenças na progressão da cultura de 24h para 48h e de 24h para 72h ($p < 0,05$), evidenciando que o grupo TiAg, em 24h, apresentou, em média, valores menores que nos demais momentos de armazenagem, ou seja, a progressão da cultura foi significativamente maior em 48h ($p < 0,05$), atingindo um pico e regredindo, sem significância, em 72h (tabela 5.5 e gráfico 5.2).

Tabela 5.4-Resultados referentes às amostras do grupo TiAg, relativos às absorbâncias obtidas das leituras do MTT nos três tempos experimentais

TiAg	24h	48h	72h
Média	0,049	0,160	0,121
Mediana	0,043	0,156	0,117
δ	0,018	0,012	0,013
Mínimo	0,035	0,151	0,111
Máximo	0,069	0,174	0,136

$p=0,011$

Tabela 5.5-Comparações múltiplas dentro do grupo TiAg, entre os tempos experimentais, para determinar a progressão da cultura

Grupo de referência		grupo de comparação	p-valor
24h	Vs	48h	0,040
24h	Vs	72h	0,004
48h	Vs	72h	0,203

Gráfico 5.2-Comparação das médias de absorbâncias nos tempos experimentais, demonstrando a progressão da cultura na amostra TiAg

5.1.3 Progressão da cultura de osteoblastos no grupo TiAA

Neste grupo, observou-se que houve diferença entre os tempos experimentais ($p < 0,05$) (tabela 5.6). Pelos resultados das comparações múltiplas, esta diferença ocorreu com significância de 24h a 48h e de 24 a 72h ($p < 0,05$) (tabela 5.7), evidenciando que o grupo TiAA, em 24h, apresentou uma média de valores menor que nos demais momentos. Por outro lado, a progressão da cultura foi significativamente maior em 48h, de modo a atingir um pico, regredindo, sem significância, em 72h (gráfico 5.3).

Tabela 5.6-Resultados referentes às amostras do grupo TiAA, relativos às absorbâncias obtidas das leituras do MTT nos três tempos experimentais

TiAA	24h	48h	72h
Média	0,035	0,161	0,132
Mediana	0,034	0,152	0,132
δ	0,004	0,028	0,002
Mínimo	0,032	0,139	0,130
Máximo	0,040	0,192	0,134

P=0,010

Tabela 5.7-Comparações múltiplas dentro do grupo TiAA, entre os tempos experimentais, para determinar a progressão da cultura

Grupo de referência		grupo de comparação	p-valor
24h	vs	48h	0,049
24h	vs	72h	0,004
48h	vs	72h	0,586

Gráfico 5.3-Comparação das médias de absorbâncias nos tempos experimentais, demonstrando a progressão da cultura no grupo TiAA

5.1.4 Progressão da cultura de osteoblastos no grupo SiO₂

Na comparação da evolução da cultura, entre os tempos experimentais, houve diferença estatística ($p < 0,05$) (tabela 5.8). O resultado das comparações múltiplas demonstrou que a atividade celular foi significativamente maior em 48h que nos demais tempos, 24 e 72h ($p < 0,05$) (tabela 5.9). O grupo SiO₂, após 48h de incubação, apresentou um pico de crescimento com média de valor maior que nos demais momentos (gráfico 5.4). A progressão da atividade celular, de 24h para 72h, não apresentou diferença estatística ($p \geq 0,05$).

Tabela 5.8-Resultados referentes às amostras do grupo SiO₂, relativos às absorbâncias obtidas das leituras do MTT nos três tempos experimentais

SiO ₂	24h	48h	72h
Média	0,110	0,201	0,078
Mediana	0,112	0,210	0,079
δ	0,036	0,022	0,002
mínimo	0,073	0,176	0,076
máximo	0,144	0,217	0,080

Valor de $p = 0,015$

Tabela 5.9-Comparações múltiplas dentro do grupo SiO₂, entre os tempos experimentais, para determinar a progressão da cultura

Grupo de referência		grupo de comparação	p-valor
24h	Vs	48h	0,030
24h	Vs	72h	0,840
48h	Vs	72h	0,034

Gráfico 5.4-Comparação das médias de absorbâncias nos tempos experimentais, demonstrando a progressão da cultura no grupo SiO₂

5.1.5 Progressão da cultura de osteoblastos no grupo CN

O grupo controle CN apresentou diferença entre os tempos experimentais ($p < 0,05$) (tabela 5.10). Nas comparações múltiplas, os resultados apontaram que os maiores valores foram registrados após 72h de incubação com diferença significativa aos demais tempos ($p < 0,05$) (tabela 5.11). A progressão da cultura ocorreu sem alterações significantes entre 24h e 48h, sendo que, em 72 h, houve intensa atividade celular (gráfico 5.5), o que resultou em um crescimento estatisticamente relevante de 24h para 72h (tabela 5.11).

Tabela 5.10-Resultados referentes às amostras do grupo CN, relativos às absorbâncias obtidas das leituras do MTT nos três tempos experimentais

CN	24h	48h	72h
Média	0,037	0,084	0,215
mediana	0,036	0,079	0,218
δ	0,003	0,016	0,007
mínimo	0,035	0,071	0,207
máximo	0,040	0,101	0,219

$P < 0,001$

Tabela 5.11-Comparações múltiplas dentro do grupo CN, entre os tempos experimentais, para determinar a progressão da cultura

Grupo de referência		grupo de comparação	p-valor
24h	vs	48h	0,077
24h	vs	72h	0,001
48h	vs	72h	0,009

Gráfico 5.5-Comparação das médias de absorbâncias nos tempos experimentais (24h, 48h e 72h), demonstrando a progressão da cultura no grupo CN

5.1.6 Comparações entre as amostras após 24 h

Através dos resultados das comparações múltiplas observou-se que houve apenas diferença significativa nos valores de absorvâncias do grupo SiO₂ (tabela 5.13) em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), evidenciando que, em 24h, o grupo SiO₂ apresentou mais intensa atividade celular (tabela 5.12 e gráfico 5.6).

Tabela 5.12-Resultados obtidos das absorvâncias registradas na leitura do MTT, por grupo de amostra, após 24h de incubação

24 h	Grupo				
	Ti	TiAg	TiAA	SiO ₂	CN
Média	0,039	0,049	0,035	0,110	0,037
Mediana	0,034	0,043	0,034	0,112	0,036
δ	0,012	0,018	0,004	0,036	0,003
Mínimo	0,030	0,035	0,032	0,073	0,035
Máximo	0,053	0,069	0,040	0,144	0,040

Tabela 5.13-Comparações múltiplas, para determinar as diferenças entre as absorvâncias registradas na leitura do MTT das amostras, após 24h de incubação

Grupo de referência		grupo de comparação	p-valor
Ti	vs	TiAg	0,962
Ti	vs	TiAA	0,999
Ti	vs	SiO₂	0,007
Ti	vs	CN	>0,999
TiAg	vs	TiAA	0,893
TiAg	vs	SiO₂	0,018
TiAg	vs	CN	0,929
TiAA	vs	SiO₂	0,005
TiAA	vs	CN	>0,999
SiO₂	vs	CN	0,005

Gráfico 5.6-Comparação das médias de absorvâncias entre os grupos após 24h de incubação

5.1.7 Comparações entre as amostras após 48 h

Os resultados apontaram para diferenças significativas nas comparações múltiplas entre o grupo CN e os demais grupos ($p < 0,05$) (tabela 5.15), devido aos menores valores de absorbância apresentados na leitura de 48h (tabela 5.14). Isto evidenciou que, em 48h de incubação, houve uma menor atividade celular em CN (gráfico 5.7).

Tabela 5.14-Resultados obtidos das absorbâncias registradas na leitura do MTT, por grupo de amostra, após 48h de incubação

48 h	Grupo				
	Ti	TiAg	TiAA	SiO ₂	CN
Média	0,176	0,160	0,161	0,201	0,084
Mediana	0,188	0,156	0,152	0,210	0,079
δ	0,030	0,012	0,028	0,022	0,016
Mínimo	0,142	0,151	0,139	0,176	0,071
Máximo	0,197	0,174	0,192	0,217	0,101

Tabela 5.15-Comparações múltiplas, para determinar as diferenças entre as absorbâncias registradas na leitura do MTT das amostras, após 48h de incubação

Grupo de referência		grupo de comparação	p-valor
Ti	vs	TiAg	0,912
Ti	vs	TiAA	0,924
Ti	vs	SiO ₂	0,648
Ti	vs	CN	0,004
TiAg	vs	TiAA	>0,999
TiAg	vs	SiO ₂	0,245
TiAg	vs	CN	0,012
TiAA	vs	SiO ₂	0,258
TiAA	vs	CN	0,012
SiO₂	vs	CN	0,001

Gráfico 5.7-Comparação das médias de absorbâncias entre os grupos após 48h de incubação

5.1.8 Comparações entre as amostras após 72 h

Os resultados das comparações múltiplas registraram que houve diferença apenas entre o grupo CN e os demais grupos ($p < 0,05$) (tabela 5.17), devido aos maiores valores registrados em 72h (tabela 5.16). Estes resultados evidenciam que o grupo CN apresentou maior atividade celular em 72h (gráfico 5.8).

Tabela 5.16-Resultados obtidos das absorvâncias registradas na leitura do MTT, por grupo de amostra, após 72h de incubação

72 h	Grupo				
	Ti	TiAg	TiAA	SiO ₂	CN
Média	0,090	0,121	0,132	0,078	0,215
mediana	0,100	0,117	0,132	0,079	0,218
δ	0,052	0,013	0,002	0,002	0,007
mínimo	0,034	0,111	0,130	0,076	0,207
máximo	0,137	0,136	0,134	0,080	0,219

Tabela 5.17-Comparações múltiplas, para determinar as diferenças entre as absorvâncias registradas na leitura do MTT das amostras, após 72h de incubação

Grupo de referência		grupo de comparação	p-valor
Ti	vs	TiAg	0,549
Ti	vs	TiAA	0,290
Ti	vs	SiO ₂	0,971
Ti	vs	CN	0,001
TiAg	vs	TiAA	0,981
TiAg	vs	SiO ₂	0,265
TiAg	vs	CN	0,006
TiAA	vs	SiO ₂	0,122
TiAA	vs	CN	0,013
SiO₂	vs	CN	<0,001

Gráfico 5.8-Comparação das médias de absorvâncias entre os grupos após 72h de incubação

5.1.9 Avaliação entre os grupos e os tempos experimentais

Estatisticamente, o ideal seria que fosse feito um teste que permitisse a comparação conjunta entre os grupos e os tempos de armazenamento avaliados. Devido ao pequeno tamanho da amostra, não foi possível realizar tal teste. Os grupos foram, portanto, analisados dois a dois. Sendo assim, para permitir a avaliação conjunta, foi construído um gráfico sobrepondo as curvas representativas das progressões da cultura no decorrer dos tempos experimentais em cada grupo de amostras, o que permitiu expor os resultados concomitantemente (gráfico 5.9).

Gráfico 5.9-Comparação das curvas de progressão das culturas entre os grupos, determinadas pelas médias das absorvâncias registradas nas leituras das amostras (MTT), no decorrer dos tempos experimentais

5.2 MEV

Os discos TiAg, TiAA e SiO_2 , foram submetidos à análise por MEV, após 24h de incubação, e comparados com os grupos controle Ti e Lm, com o intuito de avaliar a morfologia e adesão celular nas superfícies.

Figura 5.1-Micrografia eletrônica representativa, mostrando detalhamento das superfícies, após 24h de incubação em cultura de osteoblastos. Foi constatada presença de células aderidas (setas) e espalhadas em todas as superfícies testadas no experimento (TiAg TiAA e SiO_2), em densidade muito próxima à observada nos grupos controles Lm e Ti. Aumento original: 1.500X

Todas as amostras apresentaram células aderidas em suas superfícies, conforme demonstrado nas fotos de MEV com 1.500 aumentos (figura 5.1).

A observação por MEV com 3.000 aumentos (figura 5.2) permitiu detalhar a topografia das amostras, de maneira a distinguir algumas características importantes.

Figura 5.2-Micrografias eletrônicas representativas, mostrando detalhamento da topografia das superfícies após o cultivo celular: a) SiO_2 com superfície lisa e homogênea; b) TiAA com topografia rugosa, aspecto pontilhado; c) TiAg: sítio com microtrincas - aspecto "craquelado"; d) TiAg: sítio com cobertura danificada - regiões ausentes de células aderidas. Aumento original: 3.000X; e) Aspecto geral da amostra TiAg. Aumento original: 40X

Após 24h em cultivo celular, a amostra SiO₂ expôs uma cobertura de superfície homogênea e lisa (figura 5.2a), ao passo que TiAA demonstrou superfície com rugosidade moderada, de aspecto pontilhado e homogêneo (figura 5.2b). A amostra TiAg, por sua vez, apresentou-se bastante heterogênea (figura 5.2e), com sítios vastamente trincados, conferindo um aspecto “craquelado” (figura 5.2c), e outras regiões lisas (figura 5.2d). As rugosidades das amostras TiAA e TiAg, sejam microtrincas ou pontilhadas, não interferiram na adesão dos osteoblastos. Nos sítios da superfície do disco TiAg identificados como lisos, no entanto, não foram detectadas células aderidas, mas continham estruturas semelhantes a uma teia ou vidro trincado, sugerindo que possa ter ocorrido retração do filme e consequente falha na cobertura.

Com exceção das regiões defeituosas do disco TiAg, as células da linhagem MC3T3-E1 aderiram a todas as superfícies. Devido ao alinhamento da superfície das células com a superfície do substrato, acompanhado pelo achatamento e espalhamento, foi revelada a topografia do substrato imediatamente abaixo das células (figura 5.3). Ainda foram identificados filopódios nas extensões das membranas celulares, sobre as amostras Ti, TiAA, SiO₂ e Lm, (figura 5.3), indicando a adesão dos osteoblastos.

Figura 5.3-Micrografias eletrônicas representativas, mostrando detalhes dos osteoblastos cultivados sobre as superfícies. Filopódios (setas) visualizados nas membranas celulares sobre as amostras SiO₂, Ti, TiAA e Lm, indicam adesão celular às superfícies. Aumento original: 10.000X

6 DISCUSSÃO

Após a cirurgia de implante dentário, a infecção é uma preocupação constante, posto que os implantes e seus componentes transmucosos servem de substrato para a adesão de proteínas (2, 108), formação e maturação de biofilmes, ocasionando posterior colonização por microrganismos patogênicos em curto e longo prazo (35, 95, 115).

No âmbito da prevenção e controle de contaminações dos dispositivos implantares, as estratégias não se restringem somente aos mecanismos de ação antibacteriana disponíveis, mas devem buscar, igualmente, o aprimoramento das estruturas que contribuem para a defesa do organismo hospedeiro. Uma boa alternativa é a promoção da adesão celular e regeneração tecidual em contato íntimo com a superfície do implante, acarretando na redução de superfície disponível para adesão e colonização microbianas (95).

Esta pesquisa avaliou o comportamento da linhagem de osteoblastos MC3T3-E1 exposta a três superfícies nanoestruturadas, aplicadas sobre titânio comercialmente puro, por meio de ensaio de toxicidade direta MTT e análise morfológica em MEV.

Os resultados obtidos das leituras do ensaio MTT, no decorrer dos tempos (24, 48 e 72h), registraram similaridade nos comportamentos das superfícies nanoestruturadas (TiAg, TiAA e SiO₂) ao grupo controle Ti, quanto à atividade dos osteoblastos. Contudo, as amostras SiO₂ representaram o grupo que registrou maior média de absorbância na leitura, em 24h, ocasionada por uma atividade celular significativamente maior, inclusive, superior aos grupos controle Ti e CN.

Para entender esses resultados, a MEV, em 24 h de incubação, possibilitou observar os osteoblastos, apresentando uma morfologia que reflete a tentativa de adaptação e ancoragem às amostras de todos os grupos. A submissão das amostras à MEV, após 24h, propiciou tempo suficiente para que as células pudessem se restabelecer da tripsinização e se reorganizarem em uma MEC, sem que houvesse um adensamento capaz de interferir na morfologia e adesão celular (99). De fato, todas as amostras exibiram células achatadas, alinhadas e espalhadas aos substratos, possibilitando revelarem a topografia da superfície abaixo. Estas características morfológicas sugerem que houve uma forte adesão, originada pelas ligações moleculares entre os receptores da membrana celular com a superfície (106). Além disso, as amostras teste, SiO₂ e TiAA, e controles, Ti e Lm, apresentaram as bordas das

membranas celulares desenvolvendo filopódios. Esses achados são sugestivos da interação celular com as superfícies (104), o que favorece a fixação, organização do citoesqueleto e proliferação (106), e condiz com a fase do ciclo celular em que a cultura se encontrava (99). Muitas publicações, ainda, apoiam que a quantidade de área de contato da célula com a superfície, proporcionada pelo espalhamento celular, está frequentemente relacionada com a intensidade de estímulo para adesão (106).

Portanto, os resultados do MTT podem ter refletido os achados morfológicos, já que todo o processo de reconstrução do citoesqueleto, secreção de MEC e alterações morfológicas, inerentes ao espalhamento e adesão ao substrato (99, 106), no período de 24h, demandam intensa atividade celular, detectável de maneira inespecífica e quantificada no ensaio de MTT (111-112).

O grupo CN, no entanto, apesar de seu comportamento parecido com os grupos Ti, TiAg e TiAA, sem diferença estatística, nas primeiras 24h, apresentou progressão mais lenta e sistematicamente crescente no decorrer do experimento, permanecendo com sua média de absorbância significativamente inferior, em 48h, mas atingindo um pico de atividade celular acima das outras superfícies, em 72h de incubação. É possível que esta discrepância na evolução do grupo CN, em relação ao controle Ti e as amostras testadas no ensaio MTT, tenha decorrido de dois fatores: a característica topográfica das superfícies nanoestruturadas e a presença de óxidos nas superfícies de titânio.

Osteoblastos, quando cultivados em discos de titânio puro, demonstram boa proliferação celular (2), o que sugere excelente biocompatibilidade e um alto potencial para a osseointegração. O titânio é um metal reativo, ou seja, ao entrar em contato com eletrólitos aquosos e ar, tende a formar espontaneamente uma película de dióxido de titânio em sua superfície (TiO_2), conferindo uma natureza anfotérica, capaz de se ligar com ácidos e bases (2). Uma característica dos filmes nanoestruturados deste experimento é a deposição em “ilhas”, possibilitando a exposição do substrato de titânio. A análise química por EDX das amostras com aplicação das nanoestruturas SiO_2 , TiAA e TiAg, detectou altos índices de titânio nas superfícies, o que pode ter levado à formação da camada de TiO_2 , ao contato com o ar ou meio de cultura, favorecendo a adesão celular inicial. Esta hipótese é corroborada por achados no experimento realizado por Svensson et al. (85) em superfícies de implantes de titânio revestidos com filme nanoestruturado, composto por uma mistura de metais nobres (ouro, prata e paládio), em que foram identificados, como elementos dominantes

nas superfícies, o TiO_2 e o oxigênio, tanto nas superfícies revestidas (teste) quanto nas de Ti puro (controle), o que levou à osseointegração dos implantes, em tíbia de coelho, após 12 semanas.

As alterações topográficas de superfície das nanoestruturas, por sua vez, desempenharam um papel importante. Quando observadas sob MEV-FEG, demonstraram superfícies com características particulares para cada aplicação de material, promovendo uma nanotopografia distinta, com partículas dos elementos ativos dispersas e pouca densidade desses materiais. A baixa proporção de partículas ativas espalhadas nas nanoestruturas já é um elemento favorável para a citocompatibilidade, visto que a adesão celular e a proliferação óssea em superfícies diminuem na medida em que há um aumento da concentração de nanopartículas aplicadas ao revestimento (116). Ainda, as amostras Ti e SiO_2 exibiram topografias similares, com estrias suaves e paralelas, em consequência do processo de usinagem, ao passo que as superfícies nanoestruturadas TiAA e TiAg demonstraram maiores irregularidades distribuídas por toda a superfície. Em visualizações com maiores amplitudes, estas diferenças se destacaram, de modo a conferir um gradativo aumento de rugosidade nas superfícies SiO_2 , TiAA e TiAg, respectivamente, sendo que a amostra TiAg apresentou sulcos profundos, irregulares e picos mais elevados. Mesmo diante desta diversidade topográfica de superfícies, as imagens do cultivo celular sobre as amostras, coletadas por MEV, não destacaram diferenças na adesão celular inicial entre os grupos, nem mesmo em relação ao controle Lm (lamínula de vidro).

A topografia rugosa em superfície do substrato de titânio é capaz de aprimorar a adesão celular (17). As nanoestruturas podem promover esse mesmo efeito, pois representam uma alteração de topografia em nanoescala, melhorando a aderência de osteoblastos (92-93). Passeri et al. (17), ao expor cultura primária de osteoblastos humanos a diferentes tipos de topografias de superfícies em titânio, verificou que as superfícies moderadamente rugosas estimularam uma produção mais elevada de osteocalcina que superfícies lisas ou com rugosidade muito exacerbada, além de demonstrarem melhor adesão celular inicial, contatos célula-célula e maiores níveis de atividade e diferenciação dos osteoblastos (17). Ademais, Deligianni et al. (117) observaram que a adsorção da fibronectina, glicoproteína promotora da ligação das integrinas da membrana celular à MEC, foi incrementada, quando a cultura primária de osteoblastos humanos foi exposta a uma superfície rugosa.

Um fato curioso foi que a curva desenhada pelas amostras testadas e o controle Ti, de 48 para 72h, expôs um decréscimo nas médias de absorbâncias, não representativo, para as superfícies Ti, TiAg e TiAA, ao passo que para o grupo SiO₂ a redução foi considerável, no mesmo período. Este decréscimo das absorbâncias nas superfícies dos discos compostos por substrato de titânio, revestidos ou não, pode estar relacionado à queda na atividade dos osteoblastos de 48h para 72h., provavelmente por terem atingido a fase estacionária do seu ciclo de crescimento. Isso ocorre porque, cada vez que uma linhagem celular é sub cultivada, como é o caso do preparo das amostras para o ensaio MTT, as células se recuperam da tripsinização, entre 12 e 24h em meio de cultura, dando início a um crescimento exponencial subsequente, durante o qual a população celular dobra ao longo de um período, específico para cada tipo de linhagem (99). Assim, a população de células fica mais adensada e todo o substrato é ocupado, as células alteram sua morfologia, menos espalhadas na superfície, entrando numa fase estacionária, com queda no crescimento próximo a zero (99). Agregado a esse fato, é possível que o adensamento celular, promovido pela expansão da cultura sobre o substrato, também tenha ocasionado uma limitação da perfusão dos nutrientes, presentes no meio de cultura utilizado (118). Em populações celulares normais, isso conduz a uma interrupção do ciclo celular, enquanto que, em células transformadas, como é o caso da cultura de células imortalizadas deste estudo, a interrupção é muito menos eficaz e as células tendem a entrar em apoptose (99). Esta hipótese do esgotamento do meio, decorrente do crescimento populacional, levando à morte celular, foi proposta por Mosmann (111), quando verificou uma não linearidade na curva obtida pelas médias de absorbâncias resultantes do MTT em relação ao tempo de incubação, representando um refreamento na progressão da cultura. A hipótese proposta pelo autor e posteriormente confirmada por Gerlier e Thomasset (112) é de que este comportamento, frente ao MTT, está relacionado com a morte progressiva das células durante o ensaio MTT. Especificamente, no caso da pesquisa de Mosmann (111), pode ter decorrido do esgotamento do fator de crescimento durante o aumento da população celular.

Como observado, as superfícies SiO₂, TiAA, TiAg e o controle Ti apresentaram valores de absorbância significativamente maiores que o Controle CN e, conseqüentemente, um pico de atividade celular no período de 48h. Esta curva, possivelmente representa um maior adensamento populacional, o qual culminou na redução dos valores de absorbância registrados em 72h de incubação. A exceção desse comportamento foi apresentada pelo

grupo CN, presumivelmente, por possuir uma natureza química em sua superfície (polipropileno), que ofereceu condições para uma evolução mais lenta e gradativa no decorrer dos tempos experimentais, tenha atingido o adensamento populacional num período posterior aos demais grupos.

Este comportamento das amostras nanoestruturadas pode se referir à promoção da rugosidade na superfície, capaz de aprimorar os níveis de atividade celular (117). A natureza anfotérica do TiO_2 (2), presente nas amostras, também pode ter contribuído para esses resultados apresentados. Portanto, seguindo esse padrão de desempenho frente aos osteoblastos, as características de superfície dos discos com substrato de titânio (Ti, TiAg, TiAA e SiO_2), provavelmente, influenciaram nos resultados mais elevados no ensaio MTT, que a superfície polida de polipropileno do grupo CN, em 48 h, e também na discrepância significativamente inferior ao CN, em 72h.

A superfície SiO_2 foi a que apresentou maiores níveis de titânio em sua superfície, na análise por EDX, o que pode explicar os melhores resultados obtidos nas leituras do MTT em 24h e 48h. Supõe-se que as coberturas nanoestruturadas de prata, desenvolvidas para este estudo, possuam estabilidade, por não liberarem o seu princípio ativo, Ag^+ . Por esta razão, a eficiência do material permanece por longo tempo ou até por toda a vida útil do produto, sem que haja necessidade de substituição ou reposição. Todavia, esta característica, bem como os mecanismos que proporcionam a aderência da nanoestrutura ao substrato, devem ser investigados em estudos futuros.

Durante a observação em MEV, foram identificados defeitos na superfície TiAg, semelhantes a microfraturas e, em alguns pontos, visualizaram-se imagens sugestivas de perda do revestimento. É possível que esses defeitos tenham sido provocados por alguma falha técnica, durante a aplicação do filme, pois moléculas de filmes conjugados ao substrato são em geral ligadas fortemente (97) e não justificaria o desprendimento espontâneo. Uma hipótese para esta falha pode ser a aplicação do filme com maior espessura. As zonas mais superficiais da película tendem a se condensar independentemente da formação das ligações internas com o substrato. Quando a espessura do filme é pequena, de algumas camadas moleculares, as partículas mais externas só terão de sofrer alguns deslocamentos menores, a fim de ocupar as vagas subjacentes, durante a condensação. Com o aumento da espessura da película, no entanto, as zonas exteriores não sofrem esta acomodação às camadas mais internas, levando a promoção de fissuras reticulares. Outra hipótese é a

diferença na expansão térmica entre a película e o substrato. Se a expansão térmica da película é menor que a do substrato e a película for aplicada sobre um substrato a temperaturas relativamente baixas, ocorre uma tensão de tração no filme, quando houver o aumento da temperatura durante o tratamento térmico, por exemplo (97), e consequente ruptura. Todavia, esta e outras variantes devem ser melhor investigadas em estudos futuros.

O presente experimento foi realizado utilizando um modelo experimental consagrado, *in vitro*, que permite a detecção de falência na cadeia respiratória na presença de toxicidade, através do teste MTT. Ademais, uma acurada observação do cultivo de osteoblastos sobre as superfícies, por meio de MEV, pôde complementar os testes, favorecendo a detecção da adesão celular ou qualquer alteração morfológica que conduza à morte celular ou apoptose. A cultura de células procura criar um ambiente mais próximo ao fisiológico, por adição de quantidades adequadas de sal, glicose, aminoácidos, vitaminas e soro. Entretanto, com ausência de arquitetura do tecido e de uma população com tipos celulares heterogêneos, em muitos casos, deixa de contemplar as interações célula-célula, presença de secreções, assim como outras funções pertinentes ao contexto tecidual, reações inflamatórias e imunológicas. Ainda assim, experimentos *in vivo* oferecem maior risco de viés, justamente pela interferência de diversos fatores fisiológicos, nem sempre passíveis de controle no decorrer do estudo. Porém, é importante salientar que verificações de toxicidade das superfícies ora testadas, *in vitro*, devam também ser realizadas sob condições fisiológicas reais.

Esse experimento focou em testar a citocompatibilidade de biomateriais com potencial para impedir a adesão e proliferação bacteriana inicial em implantes dentários, bem como impedir a colonização das superfícies dos implantes expostos ao meio bucal, decorrente da reabsorção óssea, em doenças peri-implantares já instaladas, através da incorporação da prata em superfície. Por isso, houve a preocupação em utilizar osteoblastos nos testes de toxicidade, por ser esta uma célula essencial no processo de reparação óssea e osseointegração: está presente na interface osso-implante (42), é responsável pela formação de matriz óssea (104) e, quando aderida à superfície dos dispositivos implantados, pode concorrer com a fixação do biofilme bacteriano, na “corrida pela superfície” (95). Contudo, são necessários mais estudos com o intuito de confirmar a atividade antimicrobiana, a toxicidade em cultura de fibroblastos e a estabilidade e resistência destas nanoestruturas, com vistas à aplicação em implantes e componentes protéticos.

Os filmes nanoestruturados SiO₂, TiAg e TiAA, podem ser uma boa opção de biomaterial para revestir superfícies de implantes endósseos de titânio, já que não ofereceram toxicidade à linhagem de osteoblastos, conforme resultados do ensaio MTT e observação de morfologia celular em MEV. Da mesma forma, todas as amostras favoreceram a adesão celular, primeira condição para que haja a promoção da reparação óssea e osseointegração de implantes.

Dentre as amostras contendo Ag, o grupo SiO₂ se destacou nas primeiras 24h do ensaio MTT, registrando uma atividade celular significativamente maior que todos os grupos. A presença da Ag na composição, ainda que em proporção maior que o grupo TiAg, parece não ter provocado toxicidade. Uma explicação pode estar no tamanho maior das partículas ativas (200nm), que apesar de inseridas em uma nanoestrutura, não são consideradas AgNp (até 100nm). Contrariando as expectativas, seu desempenho sugere ser uma superfície estimulante para atividade osteoblástica. Porém, os mecanismos que expliquem este resultado necessitam uma investigação mais acurada.

A aplicação dos filmes nanoestruturados em substrato de titânio vem confirmando ser uma técnica promissora no desenvolvimento de biomateriais para a implantodontia, por demonstrar excelente desempenho na promoção da adesão celular, além de permitir a associação de materiais antibacterianos, podendo contribuir, futuramente, para uma osseointegração mais eficiente e controle da fixação do biofilme e colonização bacteriana.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos dos ensaios MTT associados à análise morfológica e de adesão celular, através de imagens em MEV, é possível inferir que os filmes nanoestruturados, SiO₂, TiAg e TiAA, aplicados em substrato de titânio comercialmente puro e polido, são compatíveis a cultura de linhagem imortalizada de osteoblastos (MC3T3-E1).

REFERÊNCIAS⁴

1. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1977;16:1-132.
2. Steinemann, SG. Titanium--the material of choice? *Periodontol* 2000. 1998 Jun;17:7-21. Review.
3. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981;10:387-416.
4. Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E, et al. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol.* 1987 Dec;2(4):145-51.
5. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res.* 2003 Feb;82(2):82-90.
6. Safii SH, Palmer RM, Wilson RF. Risk of implant failure and marginal bone loss in subjects with a history of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010 Sep;12(3):165-74.
7. Kim KK, Sung HM. Outcomes of dental implant treatment in patients with generalized aggressive periodontitis: a systematic review. *J Adv Prosthodont.* 2012 Nov;4(4):210-7.
8. Clementini M, Rossetti PH, Penarrocha D, Micarelli C, Bonachela WC, Canullo L. Systemic risk factors for peri-implant bone loss: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Mar;43(3):323-34. doi:10.1016/j.ijom.2013.11.012.
9. Karoussis IK, Kotsovilis S, Fourmouis I. A comprehensive and critical review of dental implant prognosis in periodontally compromised partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18:669-79.
10. Klinge B. Peri-implant marginal bone loss: An academic controversy or a clinical challenge? *Eur Oral Implantol.* 2012;5(Suppl):S13-S19.
11. Lindhe J, Meyle J, Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant disease: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(8 Suppl):282-5.
12. Serino G, Ström C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Feb;20(2):169-74.
13. Todescan S, Lavigne S, Kelekis-Cholakakis A. Guidance for the maintenance care of dental implants: clinical review. *J Can Dent Assoc.* 2012;78:c107.
14. Atieh MA, Alsabeeha NH, Faggion CM Jr, Duncan WJ. The Frequency of Peri-Implant Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol.* 2012 Dec 13.

⁴ De acordo com estilo Vancouver

15. Von Troil-Lindén B, Torkko H, Alaluusua S, Wolf J, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Periodontal findings in spouses. A clinical, radiographic and microbiological study. *J Clin Periodontol.* 1995 Feb;22(2):93-9.
16. Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodontal Res.* 1989 Mar;24(2):96-105.
17. Passeri G, Cacchioli A, Ravanetti F, Galli C, Elezi E, Macaluso GM. Adhesion pattern and growth of primary human osteoblastic cells on five commercially available titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Jul;21(7):756-65. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01906.x.
18. Vlacic-Zischke J, Hamlet SM, Friis T, Tonetti MS, Ivanovski S. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGFβ/BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials.* 2011 Jan;32(3):665-71. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.09.025.
19. Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV. Treatment of Peri-implantitis: What interventions are effective? A Cochrane Systematic Review. *Eur J Oral Implantol.* 2012;5(Suppl):S21-S41.
20. Meyle J. Mechanical, chemical and laser treatments of the implant surface in the presence of marginal bone loss around implants. *Eur J Oral Implantol.* 2012;5(Suppl):S71-S81.
21. Romeiro RL, Pereira C, da Silva AV, Bertramel LA, Jorge AOC. Aderência de microrganismos em implantes dentários de superfície lisa ou tratada. *Innov. implant. j., biomater. esthet. (Impr.).* 2010 maio-ago;5(2):25-9.
22. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 1998 Jun;17:63-76.
23. van Winkelhoff AJ. Antibiotics in the treatment of peri-implantitis. *Eur J Oral Implantol.* 2012;5(Suppl):S43-S50.
24. Norowski PA, Jr, Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review. *J Biomed Mater Res. Part B Appl Biomater.* 2009 Feb;88(2):530-43.
25. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Feb;13(1):1-19. Review.
26. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett* 2008;176:1-12.
27. Wang R, Neoh KG, Kang ET, Tambyah PA, Chiong E. Antifouling coating with controllable and sustained silver release for long-term inhibition of infection and encrustation in urinary catheters. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014 Jun 12. doi: 10.1002/jbm.b.33230.
28. Pishbin F, Mouriño V, Gilchrist JB, McComb DW, Kreppel S, Salih V, Ryan MP, Boccaccini AR. Single-step electrochemical deposition of antimicrobial orthopaedic coatings based on a bioactive glass/chitosan/nano-silver composite system. *Acta Biomater.* 2013 Jul;9(7):7469-79.
29. Guthrie KM, Agarwal A, Teixeira LB, Dubielzig RR, Abbott NL, Murphy CJ, Singh H, McAnulty JF, Schurr MJ. Integration of silver nanoparticle-impregnated polyelectrolyte

multilayers into murine-splinted cutaneous wound beds. *J Burn Care Res.* 2013 Nov-Dec;34(6):e359-67.

30. Velmurugan P, Lee SM, Cho M, Park JH, Seo SK, Myung H, Bang KS, Oh BT. Antibacterial activity of silver nanoparticle-coated fabric and leather against odor and skin infection causing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014 Oct;98(19):8179-89.

31. Dobias J, Bernier-Latmani R. Silver release from silver nanoparticles in natural waters. *Environ Sci Technol.* 2013 May 7;47(9):4140-6.

32. Kumar D, Kumari J, Pakrashi S, Dalai S, Raichur AM, Sastry TP, Mandal AB, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Qualitative toxicity assessment of silver nanoparticles on the fresh water bacterial isolates and consortium at low level of exposure concentration. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014 Oct;108:152-60.

33. Melaiye AYW. Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opin Ther Pat.* 2005;15:125–130.

34. Bondarenko O, Ivask A, Kinen A, Kurvet I, Kahru A. Particle-cell contact enhances antibacterial activity of silver nanoparticles. *PLoS One.* 2013 May 30;8(5):e64060. doi: 10.1371/journal.pone.0064060.

35. Dror-Ehre A, Adin A, Mamane H. Control of membrane biofouling by silver nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa* as a model bacterium. *Desalin Water Treat.* 2012;48: 130–7.

36. Percival SL, Bowler PG, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect.* 2005;60:1–7.

37. Gordon O, Vig Slenters T, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, Landmann R, Fromm KM. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Oct;54(10):4208-18. doi:10.1128/AAC.01830-09.

38. Cao H, Qiao Y, Liu X, Lu T, Cui T, Meng F, Chu PK. Electron storage mediated dark antibacterial action of bound silver nanoparticles: smaller is not always better. *Acta Biomater.* 2013 Feb;9(2):5100-10. doi:10.1016/j.actbio.2012.10.017.

39. Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, Blinova I, Aruoja V, Suppi S, Vija H, Kinen A, Titma T, Heinlaan M, Visnapuu M, Koller D, Kisand V, Kahru A. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS One.* 2014 Jul 21;9(7):e102108. doi: 10.1371/journal.pone.0102108.

40. Brnemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrm J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969;3(2):81-100.

41. Schroeder A, Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1981;9:15–25.

42. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Jun;14(3):251-62.

43. Berglundh T, Abrahamsson I, Welander M, Lang NP, Lindhe J. Morphogenesis of the peri-implant mucosa: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Feb;18(1):1-8.
44. 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 Apr-Jun;2(2):81-90.
45. Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1992 Mar;3(1):1-8.
46. Schwartz-Arad D, Samet N, Samet N, Mamlider A. Smoking and complications of endosseous dental implants. *J Periodontol.* 2002 Feb;73(2):153-7.
47. Friberg B, Raghoobar GM, Grunert I, Hobkirk JA, Tepper G. A 5-year prospective multicenter study on 1-stage smooth-surface Brånemark System implants with early loading in edentulous mandibles. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008 May-Jun;23(3):481-6.
48. Simonis P, Dufour T, Tenenbaum H. Long-term implant survival and success: a 10-16 year follow-up of non-submerged dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Jul;21(7):772-7.
49. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci.* 1998 Feb;106(1):527-51.
50. Reina N, Delaunay C, Chiron P, Ramdane N, Hamadouche M. Société française de chirurgie orthopédique et traumatologique. Infection as a cause of primary total hip arthroplasty revision and its predictive factors. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2013 Sep;99(5):555-61. doi: 10.1016/j.otsr.2013.07.001.
51. Nôia CF, Ortega-Lopes R, de Moraes M, Moreira RWF, Mazzonetto R. Deriving complications from the treatment with dental implants: Retrospective analysis of seven years. *Rev Assoc Paul Cirurg Dent.* 2010;64(1):55-8.
52. Smith RA, Berger R, Dodson TB. Risk factors associated with dental implants in healthy and medically compromised patients. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992 Fall;7(3):367-72.
53. Nelson S, Thomas G. Bacterial persistence in dentoalveolar bone following extraction: a microbiological study and implications for dental implant treatment. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010 Dec;12(4):306-14. doi: 10.1111/j.1708-8208.2009.00165.x.
54. Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol.* 2014 Dec 12. doi:10.1111/jcpe.12334.
55. Ebadian AR, Kadkhodazadeh M, Zarnegarnia P, Dahlén G. Bacterial analysis of peri-implantitis and chronic periodontitis in Iranian subjects. *Acta Med Iran.* 2012;50(7):486-92.
56. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol.* 2012 May;39(5):425-33.
57. Quirynen M, Listgarten MA. Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Brånemark. *Clin Oral Implants Res.* 1990 Dec;1(1):8-12.

58. De Boever AL, De Boever JA. Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Feb;17(1):8-17.
59. Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Feb;17(1):25-37.
60. Kocar M, Seme K, Hren NI. Characterization of the normal bacterial flora in perimplant sulci of partially and completely edentulous patients. *J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25:690-8.
61. 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 Oct;6(5):681-8.
62. Freshney RI. *Culture of animal cells.* 2nd. New York: Willey-Liss; 2000.
63. Saba-Chujfi E, Pereira SAS, Saba AK. Prevenção das doenças peri implantares. *Periodontia.* 2008;18(4):54-61.
64. Danser MM, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. Periodontal bacteria colonizing oral mucous membranes in edentulous patients wearing dental implants. *J Periodontol.* 1997;68: 209–16.
65. Berglundh T, Gislason O, Lekholm U, Sennerby L, Lindhe J. Histopathological observations on human periimplantitis lesions. *J Clin Periodontol.* 2004 May;31(5):341-7.
66. Ericsson I, Persson LG, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J, Klinge B. . Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues. *J Clin Periodontol.* 1995;22:255–61.
67. Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A, Batayha WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications.* 2006 Jan-Feb;20(1):59-68.
68. McMahon MM, Bistran BR. Host defenses and susceptibility to infection in patients with diabetes mellitus. *Infect Dis Clin North Am.* 1995 Mar;9(1):1-9. Review.
69. Haas R, Haimböck W, Mailath G, Watzek G. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *J Prosthet Dent.* 1996 Dec;76(6):592-6.
70. Strietzel FP, Reichart PA, Kale A, Kulkarni M, Wegner B, Küchler I. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2007 Jun;34(6):523-44.
71. Amoroso PF, 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 Dec; Jun, 17(6):633-7. Erratum in: *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20(6):64.
72. Schmitt CM, Nogueira-Filho G, Tenenbaum HC, Lai JY, Brito C, Döring H, Nonhoff J. Performance of conical abutment (Morse Taper) connection implants: a systematic review. *J Biomed Mater Res A.* 2014 Feb;102(2):552-74.

73. Jansen VK, Conrads G, Richter EJ. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997 Jul-Aug;12(4):527-40. Erratum in: *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997 Sep-Oct;12(5):709.
74. Baixe S, Fauxpoint G, Arntz Y, Etienne O. Microgap between zirconia abutments and titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010 May-Jun;25(3):455-60.
75. Quirynen M, van Steenberghe D. Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study. *Clin Oral Implants Res*. 1993 Sep;4(3):158-61.
76. Persson LG, Lekholm U, Leonhardt A, Dahlén G, Lindhe J. Bacterial colonization on internal surfaces of Brånemark system implant components. *Clin Oral Implants Res*. 1996 Jun;7(2):90-5.
77. Teixeira W, Ribeiro RF, Sato S, Pedrazzi V. Microleakage into and from two-stage implants: an in vitro comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 Jan-Feb;26(1):56-62.
78. Broggini N, McManus LM, Hermann JS, Medina R, Schenk RK, Buser D, Cochran DL. Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface. *J Dent Res*. 2006 May;85(5):473-8.
79. Ivanoff CJ, Widmark G, Johansson C, Wennerberg A. Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 May-Jun;18(3):341-8.
80. Keller JC, Schneider GB, Stanford CM, Kellogg B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent*. 2003;12(2):175-81.
81. Al-Nawas B, Groetz KA, Goetz H, Duschner H, Wagner W. Comparative histomorphometry and resonance frequency analysis of implants with moderately rough surfaces in a loaded animal model. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Jan;19(1):1-8. Epub 2007 Oct 16.
82. Guida L, Oliva A, Basile MA, Giordano M, Nastri L, Annunziata M. Human gingival fibroblast functions are stimulated by oxidized nano-structured titanium surfaces. *J Dent*. 2013 Oct;41(10):900-7.
83. Berglundh T, Gotfredsen K, Zitzmann NU, Lang NP, Lindhe J. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Oct;18(5):655-61.
84. 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.
85. Svensson S, Suska F, Emanuelsson L, Palmquist A, Norlindh B, Trobos M, Bäckros H, Persson L, Rydja G, Ohrlander M, Lyvén B, Lausmaa J, Thomsen P. Osseointegration of titanium with an antimicrobial nanostructured noble metal coating. *Nanomedicine*. 2013 Oct;9(7):1048-56. doi:10.1016/j.nano.2013.04.009.
86. Vargas-Reus MA, Memarzadeh K, Huang J, Ren GG, Allaker RP. Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-implantitis pathogens. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Aug;40(2):135-9.

87. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005;16: 2346–53.
88. Flores CY, Diaz C, Rubert A, Benítez GA, Moreno MS, Fernández Lorenzo de Mele MA et al. Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO₂ surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Colloid Interface Sci*. 2010 Oct 15;350(2):402-8. doi:10.1016/j.jcis.2010.06.052.
89. Zhang T, Wang L, Chen Q, Chen C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Med J*. 2014 Mar;55(2):283-91. doi: 10.3349/ymj.2014.55.2.283. Review.
90. 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. doi: 10.1021/nn800596w.
91. Vasilev K, Sah V, Anselme K, Ndi C, Mateescu M, Dollmann B et al. Tunable antibacterial coatings that support mammalian cell growth. *Nano Lett*. 2010 Jan;10(1):202-7. doi: 10.1021/nl903274q.
92. de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004;25:403-13.
93. Webster TJ, Eijofor JU. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials*. 2004;25:4731-9.
94. Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Agheli H, Sutherland D, Affrossman S, et al. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials*. 2006; 27:2980-7.
95. Gristina A. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. 1987. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 Oct;(427):4-12.
96. Suska F, Svensson S, Johansson A, Emanuelsson L, Karlholm H, Ohrlander M et al. In vivo evaluation of noble metal coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Jan;92(1):86-94.
97. Hass G, Thun RE. *Physics of thin films*. New York: Academic Press; 1969. v.5.
98. Jokinen M, Pätsi M, Rahiala H, Peltola T, Ritala M, Rosenholm JB. Influence of sol and surface properties on in vitro bioactivity of sol-gel-derived TiO₂ and TiO₂-SiO₂ films deposited by dip-coating method. *J Biomed Mater Res*. 1998 Nov;42(2):295-302.
99. Gordana VN, Freshney RI. *Culture of cell specialized cells: Culture of Cells for tissue engeneering*. Hoboken, NJ:John Willey & Sons; 2006.
100. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Mar;8(3):443-50. doi:10.1074/mcp.M800258-MCP200.
101. Hofmann P, Metterlein T, Bollwein G, Gruber M, Plank C, Graf BM et al. The myotoxic effect of bupivacaine and ropivacaine on myotubes in primary mouse cell culture and an immortalized cell line. *Anesth Analg*. 2013 Sep;117(3):634-40. doi:10.1213/ANE.0b013e31829e4197.

102. Kar S, Bagchi B, Kundu B, Bhandary S, Basu R, Nandy P, Das S. Synthesis and characterization of Cu/Ag nanoparticle loaded mullite nanocomposite system: A potential candidate for antimicrobial and therapeutic applications. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1840(11):3264-76. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.05.012.
103. Ewald A, Gluckermann SK, Thull R, Gbureck U. Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *Biomed Eng Online*. 2006;5:22.
104. Arana-Chavez VE, Bradaschia V. *Biologia celular e tecidual para odontologia moléculas, células e tecidos*. Rio de Janeiro: Elsevier;2012.
105. Macnair R, Rodgers EH, Macdonald C, Wykman A, Goldie I, Grant MH. The response of rat primary and human osteoblasts and an immortalized rat osteoblast cell line to orthopaedic materials: comparative sensitivity of several toxicity indices. *J Mater Sci Mater Med*. 1997 Feb;8(2):105-11.
106. Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Cell fitting to adhesive surfaces: A prerequisite to firm attachment and subsequent events. *Eur Cell Mater*. 2002 Jun 30;3:31-45.
107. Boudreau N, Bissell MJ. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Oct;10(5):640-6. Review.
108. Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF. Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Oct;7(5):697-706. Review.
109. Schlaepfer DD, Hunter T. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol*. 1998 Apr;8(4):151-7. Review.
110. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:697-715. Review.
111. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
112. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*. 1986 Nov 20;94(1-2):57-63.
113. Magalhães MN, Lima ACP. *Noções de probabilidade e estatística*. 2ª ed. São Paulo: IME-USP; 2000.
114. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied linear statistical models*. 4ª ed.: Times Mirror Higher Education Group; 1996.
115. Dunne, WM Jr. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:155–66.
116. Kunzler TP, Huwiler C, Drobek T, Voros J, Spencer ND. Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients. *Biomaterials*. 2007;28:5000-6.
117. Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*. 2001 Jun;22(11):1241-51.

118. Stoker, MGP. Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth. *Nature*. 1973 Nov 23;246(5430):200-3.

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo CEUA/FOUSP Nº 016/2013 referente ao projeto intitulado: "Citocompatibilidade de filme nanoestruturado contendo partículas de prata, aplicado em superfície de titânio: uma análise in vitro" sob a responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. Mario Sérgio Soares, os alunos Christiana Fontão Kassab, Victor Elias Arana-Chavez, Marcelo Munhóz Romano e Giovanna de Castro, foi analisado na presente data e considerado isento de análise da CEUA por utilizar amostras células de origem animal: linhagens celulares imortalizadas.

São Paulo, 30 de julho de 2013.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Presidente da CEUA/FOUSP