

**NATALIA CAROLINE AGUIAR TARTAROTI**

**Avaliação do potencial osteogênico da SAOS-2 crescidas sobre superfícies de titânio modificadas por diferentes tipos de tratamentos para peri-implantite**

São Paulo

2022



**NATALIA CAROLINE AGUIAR TARTAROTI**

**Avaliação do potencial osteogênico da SAOS-2 crescidas sobre superfícies de titânio modificadas por diferentes tipos de tratamentos para peri-implantite**

**Versão Corrigida**

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

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilofacial

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem

Co-orientadora: Profa. Dra. Emanuela Prado Ferraz

São Paulo

2022

Catálogo da Publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

---

Tartaroti, Natalia Caroline Aguiar.

Avaliação do potencial osteogênico da SAOS-2 crescidas sobre superfícies de titânio modificadas por diferentes tipos de tratamentos para peri-implantite / Natalia Caroline Aguiar Tartaroti; orientadora Maria da Graça Naclério Homem; co-orientadora Emanuela Prado Ferraz. - São Paulo, 2022.

107 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilofacial . -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Peri-implantite. 2. Superfície de titânio. 3. Laser. 4. Jateamento. 5. Implantoplastia. 6. Osteoblasto. I. Naclério-Homem, Maria da Graça. II. Ferraz, Emanuela Prado. III. Título.

Tartaroti NCA. Avaliação do potencial osteogênico da SAOS-2 crescidas sobre superfícies de titânio modificadas por diferentes tipos de tratamentos para peri-implantite. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 13/10/2022

### **Banca Examinadora**

Prof(a). Dr(a) Mariana Aparecida Brozski

Instituição: Estagiária do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilofaciais da Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a) Márcia Martins Marques

Instituição: Faculdade de Odontologia – Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a) Maria Cristina Zindel Deboni

Instituição: Faculdade de Odontologia – Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada



## AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, que sempre me ouvem e me acolhem. Acreditam e vibram com minhas conquistas e estão sempre ao meu lado em todos os momentos da vida.

Meus pais, **Schubert e Ângela**, sempre foram meu lugar seguro e certeza de opiniões sinceras e assertivas. Obrigada pelo esforço empregado em nossa criação e sacrifícios feitos para que hoje eu possa estar nessa posição confortável e realizada com sonhos concluídos. À minha irmã, **Jaqueline**, que além de companheira de vida é minha companheira de profissão na qual compartilhamos sonhos e ensinamentos da odontologia. Que consigamos transformar e criar sorrisos juntas por muitos anos.

Ao meu marido, **Rafael**, que está sempre ao meu lado me apoiando e sendo porto seguro. Nossa história tem muita parceria, amor, compreensão e respeito. E como fruto de nossa jornada temos agora o grande amor de nossas vidas, nosso filho **Vincenzo**. Filho, prometo lhe proporcionar acesso à luz do conhecimento e da ciência. Que você alcance voos mais altos que seus pais.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria da Graça Naclério Homem**, por compartilhar essa jornada acadêmica de 12 anos, desde a iniciação científica até a realização do sonho de um doutorado concluído. Meu muito obrigada por permitir o meu ingresso na pós-graduação e me acompanhar e acolher por todo esse tempo estando sempre presente.

À minha co-orientadora, **Profa Dra Emanuela Prado Ferraz**, por estar sempre disponível. Seu conhecimento e auxílio no laboratório foram fundamentais para que eu conseguisse terminar essa tese.

À **Profa Dra. Maria Cristina Zindel Deboni e Dra. Vera Pozzani** que acompanharam de perto minha jornada na instituição e sempre estavam dispostas a ensinar e acolher.

Aos demais professores do departamento de Cirurgia da FOUASP, por todo ensinamento nos corredores da clínica, momentos agradáveis durante as pausas e acompanhamento de nossa jornada como discentes.

À **Profa Dra. Marcia Martins Marques** que, desde a iniciação científica, esteve de portas abertas para me ajudar com as questões do laboratório.

A todos os **funcionários do departamento**, obrigada pela dedicação e por sempre nos auxiliarem.

Aos meus **colegas de pós-graduação**, por muitos anos de companheirismo e boas risadas. Uma turma que, desde o mestrado, sempre se mostrou muito profissional e humana. Foi um prazer passar esses anos ao lado de pessoas tão competentes.

Aos **alunos da graduação e iniciação científica** com os quais pude conviver durante o doutorado, pela troca de conhecimento e experiências.

Ao **Prof. Dr. Lucas Novaes Teixeira**, da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, por ter doado inúmeras vezes as linhagens de SAOS-2 e ter me socorrido prontamente quando necessário.

Às **minhas amigas**, da turma 107, que sempre estiveram presentes e de braços abertos para desabafos e comemoração dos pequenos e grandes momentos da vida.

À **Faculdade de Odontologia** e a **Universidade de São Paulo**, por ter sido minha casa desde 2009. Aqui eu me profissionalizei, porém isso foi apenas metade do que essa instituição conseguiu me proporcionar. Aprendi a olhar para o outro, construí momentos afetivos e realizei sonhos. Serei eternamente grata.



Ao **Serviço de Biblioteca**, da FOU SP, pela revisão deste trabalho.

À empresa **S.I.N. – Sistema de Implantes** por, gentilmente, nos fornecer os discos de titânio e com isso viabilizar esse trabalho.

À empresa **DMC equipamentos**, por serem sempre solícitos e nos emprestarem o laser para a realização desse projeto.

E a todas as pessoas que fizeram parte de minha jornada, direta ou indiretamente, me ajudando a realizar esse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.



*“A jornada de mil milhas começa com um único passo.”*

**Lao Tzu**



## RESUMO

Tartaroti NCA. Avaliação do potencial osteogênico da SAOS-2 crescidas sobre superfícies de titânio modificadas por diferentes tipos de tratamentos para peri-implantite [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

A popularização da reabilitação oral com implantes de titânio (Ti) coincide com o aumento da incidência de peri-implantite, o que tem preocupado a comunidade odontológica. A peri-implantite é um processo inflamatório que afeta todos os tecidos em torno do implante de Ti e resulta na perda de osso de suporte. Quando não adequadamente tratada, a doença pode evoluir até a perda do implante, impactando negativamente a qualidade de vida do paciente. Diversas opções cirúrgicas e/ou não cirúrgicas estão descritas na literatura, entre elas a implantoplastia (Imp), o jateamento com pós abrasivo (Pó) e a laserterapia (Laser). Entretanto, não há consenso sobre qual tratamento é o mais adequado e não há dados sobre o impacto destes nas superfícies do Ti, assim como os seus efeitos nas células envolvidas no processo de osseointegração. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes tratamentos na superfície do Ti, e na diferenciação osteoblástica de células da linhagem SAOS-2 crescidas sobre essas superfícies. Para tanto, discos de Ti (2 x 6 mm) comercialmente disponíveis com superfícies modificadas por adição de nano-hidroxiapatita (NANO) ou duplo ataque ácido (DAA), foram submetidos ao tratamento por plastia por brocas (implantoplastia), plastia por pó abrasivo (jateamento) e plastia por laser. Como controle foram utilizados discos NANO ou DAA sem tratamento. A topografia das superfícies foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após 24 e 72 horas de cultura, a adesão e morfologia celulares foram avaliadas por MEV; aos 1, 3 e 5 dias a viabilidade celular foi avaliada por MTT. A diferenciação celular foi avaliada pela atividade da fosfatase alcalina (ALP) aos 7, 10 e 12 dias e a produção de matriz óssea mineralizada aos 12 e 15 dias. Os dados foram comparados por teste t e ANOVA com um ou dois fatores seguido do *Student-Newman Keus*, quando necessário, e o nível de significância adotado foi de 5%. As superfícies do Ti foram modificadas na dependência do tratamento; contudo a morfologia celular foi semelhante, com células espalhadas em formato poligonal e diversos filipódeos. A

superfície NANO não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos para proliferação celular ( $p=0,384$ ) assim como não houve diferença na interação grupo-tempo ( $p=0,156$ ) e a produção de matriz mineralizada ( $p=0,444$ ) em todos os tempos experimentais; por outro lado, a atividade de ALP apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, tempos e na interação grupo-tempo ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  e  $p= 0,017$ , respectivamente). A proliferação celular de células crescidas na superfície DAA apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, tempo e na interação grupo-tempo ( $p < 0,001$ , para todas as dependências avaliadas); a atividade de ALP apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e entre os tempos ( $p= 0,002$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) e produção de matriz mineralizada apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, tempo e na interação tempo-grupo ( $p= 0,042$ ,  $p= 0,002$  e  $p= 0,001$ , respectivamente). Nossos resultados indicam que os tratamentos da peri-implantite modificam a superfície dos discos de Ti, mas mantêm a viabilidade e proliferação e o potencial de diferenciação celular. Ainda, a superfície DAA Laser se comporta de forma mais favorável frente aos tratamentos sofridos, apresentando maior atividade de ALP ( $p=0,002$ ) e produção de matriz mineralizada ( $p=0,027$ ) quando comparado a superfície NANO Laser.

Palavras-chave: Peri-implantite. Superfície de titânio. Laser. Jateamento. Implantoplastia. Osteoblasto.

## ABSTRACT

Tartaroti NCA. Evaluation of the osteogenic potential of SAOS-2 grown on titanium surfaces modified by different types of treatments for peri-implantitis [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

The popularization of oral rehabilitation with titanium (Ti) implants coincides with the increase in the incidence of peri-implantitis, which has worried the dental community. Peri-implantitis is an inflammatory process that affects all tissues around the Ti implant and results in loss of supporting bone. When not properly treated, the disease can progress to the loss of the implant, impacting the patient's quality of life. Several surgical and non-surgical options are described in the literature, including implantoplasty, blasting with abrasive powder and laser therapy. However, there are no consensus on which treatment is the most appropriate and there are no data on their impact on Ti surfaces, as well as their effects on cells involved in the osseointegration process. In this context, the aim of this study was to evaluate the effects of different treatments on the Ti surface, and on the osteoblastic differentiation of cells of SAOS-2 lineage grown on these surfaces. For this, commercially available Ti disks (2 x 6 mm) with surfaces modified by the addition of nano-hydroxyapatite (NANO) or double acid etching (DAA) were submitted to treatment by drill plasty (implantoplasty), abrasive powder plasty (blasting) and laser plasty. As control, untreated NANO or DAA disks were used. The surface topography was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). After 24 and 72 hours of culture, cell adhesion and morphology were evaluated by SEM; at 1, 3 and 5 days cell viability was assessed by MTT. Cell differentiation was evaluated by alkaline phosphatase (ALP) activity at 7, 10 and 12 days and mineralized bone matrix production at 12 and 15 days. Data were compared by t test and ANOVA with one or two factors followed by Student-Newman Keus, when necessary, and the significance level adopted was 5%. The cell morphology was similar, with cells spread out in a polygonal shape and several filipods. The NANO surface showed no statistically significant difference between treatments for cell proliferation ( $p=0.384$ ) and there was no difference in group-time interaction ( $p=0.156$ ) and mineralized matrix production ( $p=0.444$ ) at all experimental times; on

the other hand, ALP activity showed statistically significant differences between groups, times and in the group-time interaction ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$  and  $p = 0.017$ , respectively). Cell proliferation of cells grown on the DAA surface showed statistically significant differences between groups, time and in the group-time interaction ( $p < 0.001$ , for all dependencies evaluated); ALP activity showed statistically significant differences between groups and between times ( $p = 0.002$  and  $p < 0.001$ , respectively) and mineralized matrix production showed statistically significant differences between groups, time and in the time-group interaction ( $p = 0.042$ ,  $p = 0.002$  and  $p = 0.001$ , respectively). Our results indicate that peri-implantitis treatments modify the surface of Ti disks, but maintain viability and proliferation and the potential for cell differentiation. Also, the DAA Laser surface behaves more favorably in the face of the treatments, showing higher ALP activity ( $p = 0.002$ ) and mineralized matrix production ( $p = 0.027$ ) when compared to the NANO Laser surface.

Keywords: Peri-implantitis. Titanium surface. Laser. Blasting. Implantoplasty. Osteoblast.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Quadro 2.1 – Definições de saúde e doenças peri-implantares de acordo com o workshop mundial de 2017.....35
- Figura 4.1 – Disposição do dispositivo criado para manter o padrão de uso do laser nos discos de titânio. A – Disposição da mesa de trabalho e materiais utilizados. B e C confecção de dispositivo utilizando plástico e silicone de adição para a estabilização dos discos e posicionamento adequado para criar uma padronização no procedimento. D – Estabilização da ponta do laser para que o mesmo sempre estivesse posicionado a mesma distância em todos os discos.....51
- Figura 5.1 – Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos discos de titânio das superfícies modificadas por nanotopografia (NANO A,E,I,M,Q,U), NANO modificadas por implantoplastia (NANO Imp B, F, J, N, R, V)) NANO modificadas por laser (NANO Laser C, G, K, O, S, X) e NANO modificadas por pó abrasivo (NANO Pó D, H, L, P, T, Z). A-D: 1.000x (Barra de escala: 50 µm); E-H: 5.000x (Barra de escala: 10 µm); I-L: 10.000x (Barra de escala: 5 µm); M-P: 20.000x (Barra de escala: 4 µm); Q-T: 40.000x (Barra de escala: 2 µm) e U-Z: 80.000x (Barra de escala: 1 µm).....59
- Figura 5.2 – Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos discos de titânio das superfícies modificadas por duplo ataque ácido (DAA) (DAA A, E, I, M, Q, U), DAA modificadas por implantoplastia (DAA Imp B, F, J, N, R, V)) DAA modificadas por laser (DAA Laser C, G, K, O, S, X) e DAA modificadas por pó abrasivo (DAA Pó D, H, L, P, T, Z). A-D: 1.000x (Barra de escala: 50 µm); E-H: 5.000x (Barra de escala: 10 µm); I-L: 10.000x (Barra de escala: 5 µm); M-P: 20.000x (Barra de escala: 4 µm); Q-T: 40.000x (Barra de escala: 2 µm) e U-Z: 80.000x (Barra de escala: 1 µm).....63
- Figura 5.3 - Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (NANO), NANO modificadas por implantoplastia (NANO Imp), NANO modificadas por laser (NANO Laser) e NANO modificadas por pó abrasivo (NANO Pó). A-D: barra de escala: 30 µm, com 24h de cultivo celular, E-H: barra de escala: 10 µm, com 24h de cultivo celular, I-L: barra de escala: 30 µm, com 72h de cultivo celular, M-P: barra de escala: 10 µm, com 72h de cultivo celular.....66
- Figura 5.4 – Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com duplo ataque ácido (DAA), DAA modificadas por implantoplastia (DAA Imp), DAA modificadas por laser (DAA Laser) e DAA modificadas por pó abrasivo (DAA Pó). A-D: barra de escala: 30 µm, com 24h de cultivo celular, E-H: barra de escala: 10 µm, com 24h de cultivo celular, I-L: barra de escala: 30 µm, com 72h de cultivo celular, M-P: barra de escala: 10 µm, com 72h de cultivo celular.....68

- Figura 5.5 - Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (NANO), NANO modificadas por laser (NANO Laser), NANO modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e NANO modificadas por pó abrasivo (NANO Pó), por 1, 3 e 5 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos (\*) representam as diferenças estatisticamente significantes entre os tempos experimentais, independentes dos grupos (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).....69
- Figura 5.6 - Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (NANO), NANO modificadas por laser (NANO Laser), NANO modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e NANO modificadas por pó abrasivo (NANO Pó), por 7, 10 e 12 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos dentro de um mesmo tempo experimental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo em relação ao tempo experimental (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).....70
- Figura 5.7 - Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (NANO), NANO modificadas por laser (NANO Laser), NANO modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e NANO modificadas por pó abrasivo (NANO Pó), por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Asterisco (\*) indica diferença entre os tempos, independentes dos grupos experimentais. (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).....71
- Figura 5.8 - Nódulos de matriz extracelular mineralizada produzidos por células SAOS-2, cultivadas sobre superfícies de discos de titânio modificados por nanotopografia (NANO) e tratados com Laser (NANO Laser), Implantoplastia (NANO Imp) e Pó (NANO Pó), aos 12 e 15 dias.....72
- Figura 5.9 - Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana Saos-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com duplo ataque ácido (DAA), duplo ataque ácido modificada por laser (DAA Laser), duplo ataque ácido modificada por implantoplastia (DAA Imp) e duplo ataque ácido modificada por pó abrasivo (DAA Pó) por 1, 3 e 5 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos (\*) representam as diferenças estatisticamente significantes entre os tempos experimentais independentes dos grupos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos dentro de um mesmo tempo experimental. (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).....73
- Figura 5.10 - Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com duplo ataque ácido (DAA), duplo ataque ácido modificada por laser (DAA Laser), duplo ataque ácido modificada por implantoplastia (DAA Imp) e duplo ataque ácido modificada por pó abrasivo (DAA Pó), por 7, 10 e 12 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos dentro de um mesmo tempo experimental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo em relação ao tempo experimental (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).....74
- Figura 5.11 - Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com duplo ataque

ácido (DAA), duplo ataque ácido modificadas por laser (DAA Laser), duplo ataque ácido modificadas por implantoplastia (DAA Imp) e duplo ataque ácido modificadas por pó abrasivo (DAA Pó), por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos dentro de um mesmo tempo experimental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo em relação ao tempo experimental (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).....75

Figura 5.12 – Nódulos de matriz extracelular mineralizada produzidos por células SAOS-2, cultivadas sobre superfícies de discos de titânio modificados por duplo ataque ácido (DAA) e tratados com Laser (DAA Laser), Implantoplastia (DAA Imp) e Pó (DAA Pó), aos 12 e 15 dias.....76

Figura 5.13 - (A) Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (NANO) e com duplo ataque ácido (DAA) por 1, 3 e 5 dias. (B) Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies NANO e DAA por 7, 10 e 12 dias. (C) Quantificação de matriz extracelular mineralizada produzidas por SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies NANO e DAA por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).....78

Figura 5.14 - A) Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por laser (NANO Laser) e com duplo ataque ácido modificadas por laser (DAA laser) por 1, 3 e 5 dias. (B) Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por laser (NANO Laser) e com duplo ataque ácido modificadas por laser (DAA Laser) por 7, 10 e 12 dias. (C) Quantificação de matriz extracelular mineralizada produzidas por SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por laser (NANO Laser) e com duplo ataque ácido modificadas por laser (DAA Laser) por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos dentro de um mesmo tempo experimental. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).....79

Figura 5.15 - (A) Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e com duplo ataque ácido modificadas por implantoplastia (DAA Imp) por 1, 3 e 5 dias. (B) Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e com duplo ataque ácido modificadas por implantoplastia (DAA Imp) por 7, 10 e 12 dias. (C) Quantificação de matriz extracelular mineralizada produzidas por SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e com duplo ataque ácido modificadas por implantoplastia (DAA Imp) por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante no mesmo grupo em relação ao tempo experimental. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).....81

Figura 5.16 - (A) Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por pó abrasivo (NANO Pó) e com duplo ataque ácido modificadas por pó abrasivo (DAA Pó) por 1, 3 e 5 dias. (B) Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por pó abrasivo (NANO Pó) e com duplo ataque ácido modificadas por pó abrasivo (DAA Pó) por 7, 10 e 12 dias. (C) Quantificação de matriz extracelular mineralizada produzidas por SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por pó abrasivo (NANO Pó) e com duplo ataque ácido modificadas por pó (DAA Pó) por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante no mesmo grupo em relação ao tempo experimental. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).....83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina, do inglês <i>alkaline phosphatase</i>
ANOVA	Análise de variância
aPDT	do inglês, <i>antimicrobial photodynamic therapy</i> . Terapia fotodinâmica antimicrobiana
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
EDTA	do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> . Ácido etilenodiamino tetra-acético
Er,Cr:YSGG	óxido de gadolínio, escândio e ítrio dopado com cromo e érbio
Er:YAG	Érbio - Itrio-Alumínio-Granada
GaAIAs	gálio-alumínio-arseneto
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]
Nd:YAG	Neodímio - Itrio-Alumínio-Granada
PBS	do inglês <i>phosphate-buffered saline</i> . Solução salina balanceada
Mc'coy 5A	do inglês, <i>modified media formulation</i>



## LISTA DE SÍMBOLOS

mm	Milímetros
$\geq$	Maior ou igual
°	Graus
s	Segundos
mJ	Milijoules
$\mu\text{m}$	micrômetro
nm	Nanômetro
%	Por cento
W	Watts
kV	Medida de tensão elétrica kiloVolt
mL	Mililitro
rpm	Rotação por minuto
$\text{cm}^2$	Centímetro quadrado
°C	Graus Celsius
h	hora
M	Molar
mg/mL	Miligrama por mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
min	minutos
$\mu\text{mol}$	Micromolar
pH	Potencial hidrogeniônico
p	Nível descritivo ou probabilidade de significância





## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	29
3	PROPOSIÇÃO .....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	49
5	RESULTADOS .....	57
6	DISCUSSÃO .....	85
7	CONCLUSÕES .....	91
	REFERÊNCIAS .....	93
	ANEXOS .....	105



## 1 INTRODUÇÃO

Com o aumento do uso de implantes de titânio (Ti) na reabilitação oral, as doenças peri-implantares têm sido prevalentes. Sendo assim, um diagnóstico preciso é essencial para que tratamentos efetivos sejam empregados. A definição mais atual para peri-implantite baseia-se na presença ou ausência de registros clínicos e radiográficos prévios. Utilizando as informações de consultas anteriores, a peri-implantite será definida como a presença de sinais de sangramento peri-implantar e/ou supuração à sondagem suave, aumento da profundidade de sondagem em comparação aos exames anteriores e a detecção radiográfica de reabsorção óssea, além das alterações do nível ósseo que ocorrem após a remodelação óssea inicial, e que não devem ultrapassar 2 mm. Na ausência de registros radiográficos prévios, os sinais utilizados para definição de peri-implantite são a presença de sangramento e/ou supuração à sondagem suave, profundidade de bolsa maior ou igual a 6 mm e reabsorção óssea maior ou igual a 3 mm (1, 2).

A indicação de um tratamento é de suma importância para a manutenção do implante na cavidade bucal. Sabe-se que a superfície do implante de Ti desempenha um papel crucial na osseointegração. Experimentos baseados em cultivos celulares em discos de Ti são utilizados para avaliar a resposta das células osteoblásticas, trazendo luz a aspectos morfológicos e a capacidade de crescimento e diferenciação celular. As características bioquímicas e topográficas dos materiais influenciam diretamente a interação com as células tais como os processos de adesão, proliferação e diferenciação e que podem ser interpretados, em última análise, na quantidade e na qualidade do tecido ósseo formado (3, 4). Entre as características da superfície dos implantes de Ti relevantes no processo de formação óssea estão a composição química, a energia de superfície e a topografia, porém a influência de cada uma delas na formação óssea é desconhecida (5).

Estudos *in vitro* avaliaram a adesão celular e a proliferação e concluíram que os osteoblastos parecem aderir mais rapidamente em superfícies de titânio mais irregulares (6). No entanto, alguns autores concluíram que a adesão é influenciada mais pelo processo químico envolvido na superfície do que pela topografia da superfície (7). A resposta fenotípica observada pode ser atribuída ao aumento da maior produção de fatores de crescimento na presença desses substratos rugosos (3,

4, 7, 8). Baseado em resultados *in vitro* e *in vivo*, as modificações nas superfícies de Ti têm sido amplamente comercializadas, com resultados clínicos promissores. Contudo, os mecanismos envolvidos nas respostas celulares ainda precisam ser investigados

Alterações topográficas nas escalas micro e submicrométricas e nanométricas das superfícies de Ti resultam em aumento da osseointegração (9) e com isso, inúmeras empresas modificaram a topografia da superfície dos seus implantes de Ti. Os métodos que alteram as superfícies dos implantes conferindo a eles rugosidade podem ser classificados em duas técnicas: as que adicionam partículas, criando uma superfície com saliências, denominados mecanismos aditivos, como revestimentos de hidroxiapatita (HA) e fosfato de cálcio (CaP), pulverização com plasma de titânio e deposição de íons. E técnicas que removem material da superfície, criando cavidades ou poros - mecanismos de subtração, como o uso de jato de areia, ataque ácido ou a associação desses métodos (4).

Nesse contexto, manter a superfície de Ti é fundamental para a osseointegração e a longevidade do implante. Contudo, na presença de peri-implantite, o tratamento irá envolver modificações físico-químicas da superfície do Ti, e essas alterações poderão impactar nos eventos celulares e moleculares que irão conduzir à formação do tecido perdido.

As terapias propostas para o tratamento da peri-implantite baseiam-se na evidência disponível para o tratamento da periodontite. No entanto, é importante destacar que a superfície e forma dos dentes é diferente dos implantes. Assim tratar a peri-implantite e regenerar o osso perdido e identificar se a superfície de Ti tratada mantém a capacidade de estimular nova osseointegração são os objetivos para evitar a perda do implante (10, 11).

Entre as estratégias terapêuticas destacam-se (1) as terapias cirúrgicas, que visam remover o granuloma decorrente da colonização bacteriana e limpeza da superfície do implante por meio de acesso cirúrgico e aliadas às técnicas regenerativas com o uso de biomateriais ou implantoplastia e (2) terapias não cirúrgicas tais como debridamento mecânico, uso de antissépticos e antibióticos locais e/ou sistêmicos, tratamento de superfícies implantares com laser e o uso de pó abrasivo. Há evidências que sugerem a eficácia da terapia não cirúrgica para lesões de mucosite peri-implantar, mas os resultados são conflitantes ao tentar estabelecer o protocolo mais eficaz (12, 13). Revisões sistemáticas concluem que não existe

evidência confiável que possa sugerir qual poderia ser a intervenção mais efetiva para o tratamento da peri-implantite devido à complexidade das modalidades dos tratamentos propostos (14). O relatório do consenso europeu de periodontia afirmou que o tratamento não cirúrgico, quando não associado a outras intervenções terapêuticas, não é eficaz para a resolução da peri-implantite. No entanto, o uso adjunto de antibioticoterapia sistêmico ou soluções locais antimicrobianas, reduz o sangramento a sondagem e a profundidade de bolsa (15).

Ao propor um protocolo para o controle e eliminação da doença é importante identificar como a terapia irá alterar a superfície do implante de Ti, e se a superfície resultante permitirá as mesmas respostas celulares, uma vez que a reosseointegração de superfícies descontaminada depende, em grande parte, da superfície de Ti, da técnica de descontaminação e utilização de materiais regenerativos (16, 17).

Portanto, a compreensão do efeito dos diferentes tratamentos mecânicos nas superfícies de Ti é fundamental. (6). Assim esse trabalho tem como objetivo, elucidar o impacto dos tratamentos mecânicos frequentemente empregados para a peri-implantite nas superfícies de TI comercialmente disponíveis, na morfologia, proliferação e diferenciação celulares.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A peri-implantite pode levar à perda do implante osseointegrado, resultando em um impacto negativo na qualidade de vida do paciente (18, 19). Assim, com o aumento da reabilitação oral com implantes dentários, a peri-implantite tornou-se uma grande preocupação na comunidade odontológica. O tratamento das doenças peri-implantares pode ser muito desafiador e diversos fatores locais devem ser levados em consideração ao realizar o planejamento de como realizar a abordagem dessa doença.

As doenças peri-implantares são classificadas em dois grupos: a mucosite peri-implantar e a peri-implantite, de acordo com a evolução da doença.

### 2.1 Mucosite Peri-Implantar

Assim como a gengivite precede a periodontite presume-se que a mucosite inicia-se previamente à peri-implantite. A mucosite peri-implantar é caracterizada por uma lesão inflamatória presente apenas em mucosa com sinais de eritema, edema, sangramento e/ ou supuração, sem perda de estrutura óssea de suporte após a fase inicial de remodelação da instalação do implante. O sangramento à sondagem está atualmente reconhecido como um fator importante para se realizar o diagnóstico da doença. Se medidas adequadas não forem tomadas sua evolução poderá ser a peri-implantite (15, 20-22). Entretanto, com o correto tratamento, o quadro pode ser reversível (23).

Dentre os fatores de risco associados à mucosite podemos citar higiene oral inadequada resultando em acúmulo de biofilme, excesso de cimento no momento de instalação da coroa protética, a não adesão a consultas periódicas e o tabagismo. Outros problemas como doenças sistêmicas, o uso de alguns fármacos e a falta de tecido queratinizado ao redor da coroa podem resultar em inflamação local e devem ser levados em consideração (23-25).

## 2.2 Peri-Implantite

A peri-implantite é um processo inflamatório que afeta todos os tecidos ao redor do implante osseointegrado submetido a carga funcional, resultando na perda do osso de suporte além da remodelação óssea biológica inicial (23, 24, 26, 27). Devemos nos atentar e distinguir o processo fisiológico natural de remodelação que ocorre logo após a instalação dos implantes, considerando normal a perda óssea peri-implantar de 1mm durante o primeiro ano (28). A microbiota peri-implantar tem uma composição semelhante a àquela observada no sulco gengival dos dentes, assim o desenvolvimento do biofilme irá induzir respostas biológica nos tecidos duros e moles ao redor dos implantes, resultando em aprofundamento da bolsa, sangramento na sondagem, exsudação, perda óssea e mobilidade clínica, prejudicando o sucesso da reabilitação com implantes (29).

### 2.2.1 Etiologia

A resposta do tecido peri-implantar frente ao acúmulo de biofilme já é bem relatada na literatura, tanto em estudos em animais quanto em humanos (21), e a microbiota identificada em infecções peri-implantares é muito semelhante à encontrada em bolsas periodontais (30). A adesão bacteriana e a formação de biofilme na superfície do implante é frequentemente a etapa inicial para o desenvolvimento da peri-implantite (31). As substâncias pró-inflamatórias como endotoxinas bacterianas ou lipopolissacarídeos (LPS), que são moléculas que se encontram abundantemente na membrana externa das bactérias gram-negativas, desempenham um papel central na patogênese da peri-implantite e falha de implantes. Muitos estudos mostraram que o *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais comuns envolvidos na falha precoce de implantes dentários (32). Além dele, uma grande quantidade de *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* são encontrados assim como patógenos oportunistas, como *Pseudomonas aeruginosa* (21).



Além do biofilme, outros fatores etiológicos também são encontrados na literatura tais como a macro e micro geometria do implante, a conexão do componente protético e sua passividade ao ser instalado, assim como carga mecânica excessiva decorrente dos esforços mastigatórios (31).

O tratamento de superfície recebido pelos implantes alterando a sua micro geometria, tornando um implante de titânio usinado, com superfície lisa, em um implante com superfície rugosa mostrou-se eficaz e importante no aceleração do processo de ósseointegração. É sabido que as células conseguem aderir com mais facilidade nessas superfícies e se proliferarem de maneira mais rápida e eficaz. No entanto, para alguns autores o aumento da rugosidade na superfície do implante pode facilitar o acúmulo de placa e o desenvolvimento da peri-implantite. Para eles a rugosidade da superfície dos implantes tem um impacto significativo na quantidade e na qualidade da placa bacteriana formada (33). Superfícies ásperas e aquelas que apresentam maior energia livre superficial, que diz respeito à uma influência direta nos fenômenos como molhabilidade e adesão, tendem a acumular mais placa. Além disso, a adesão bacteriana inicial começa em áreas de alta molhabilidade (característica do titânio) e no interior das cavidades e sulcos das superfícies rugosas, sendo de difícil eliminação (34). De encontro à essa concepção, há outros autores que apontam que não há prejuízo em se instalar implantes com superfícies rugosas em pacientes propensos a peri-implantite.

A taxa de progressão da doença, quando comparada à periodontite, é mais rápida na peri-implantite. Isso resulta em perda óssea mais acentuada e severa em comparação com a doença periodontal, isso pode ocorrer devido ao mecanismo de defesa do hospedeiro e a ausência de um ligamento periodontal (35).

### 2.2.2 Prevalência

Estudos epidemiológicos de doenças peri-implantares são difíceis de serem realizados pois há uma diversidade de metodologias e termos usados. Para chegar a conclusões significativas com relação à prevalência e gravidade das complicações biológicas associadas a essa doença, é necessário um consenso quanto às definições e critérios. Além disso, há uma diversidade muito grande quando pensamos em

marcas, macro e micro geometria de implantes dentários além de tratamentos de superfície dificultando, assim, um ponto de vista em comum entre os autores (28).

Ainda há poucos estudos consistentes que forneçam dados sobre a prevalência de doenças peri-implantares. Detectar a prevalência de mucosite em pacientes é algo complexo pois muitas vezes não há a notificação por se tratar de uma doença reversível. Já para os casos de peri-implantite há uma dificuldade maior pois os critérios que a avaliam se mostram muito heterogêneos na literatura (36).

Diversos fatores etiológicos podem desempenhar um papel significativo na prevalência e progressão da infecção tais como o macro e micro design do implante, a conexão protética, a passividade da prótese ao ser instalada e carga mecânica excessiva. Além disso, a periodontite e tabagismo são considerados os dois fatores de risco mais comuns relacionados a peri-implantite (31).

Lindhe e colaboradores (2008) apontaram que a mucosite ocorre em mais de 50% de todos os indivíduos portadores de implantes, enquanto a peri-implantite afeta entre 28% e 56% dos indivíduos (15). Roos-Jansaker e colaboradores (2006) relataram a presença de mucosite peri-implantar em 48% dos implantes instalados em pacientes com acompanhamento entre 9 a 14 anos (37). Já Rink e colaboradores (2011) relataram peri-implantite variando entre 1,1% a 85% dos implantes (38). A prevalência de peri-implantite também aumenta em pacientes sem cuidados regulares de manutenção (18% contra 9% em pacientes com manutenção regular).

Derks J. e Tomasi C. (2015), em uma revisão sistemática, identificaram, entre os estudos incluídos, uma prevalência de mucosite variando de 19 a 65%, enquanto a prevalência de peri-implantite variou de 1 a 47%. As médias ponderadas das prevalências encontradas nos estudos agrupados foram de 43% (IC 95%: 32-54%) para mucosite e de 22% (IC 95%: 14-30%) para peri-implantite (25).

A incidência de peri-implantite também pode estar associada com o tempo de instalação do implante, aumentando com o tempo: 0,4% em 3 anos após a colocação do implante para 43,9% após 5 anos da colocação do implante (39). Marrone e colaboradores (2013) apresentaram uma prevalência de mucosite peri-implantar e peri-implantite de 38% e 23%, respectivamente (33).

Schwarz e colaboradores (2017), em uma análise transversal, avaliaram 238 pacientes (um total de 512 implantes) por um período de 1 a 80 meses após a instalação dos implantes (média de 23 meses) e relataram que 67% dos sítios analisados possuíam peri-implantite (40). Já Ferreira e colaboradores (2006),

analisaram 578 implantes e a prevalência de mucosite peri-implantar e peri-implantite foram de 64,6% e 8,9%, respectivamente (41).

### 2.2.3 Diagnóstico

Para se realizar o diagnóstico da peri-implantite alguns critérios devem ser levados em consideração. A sondagem é essencial para o diagnóstico de doenças peri-implantares, atentando-se para que a força empregada no momento da sondagem não machuque os tecidos circundantes. Ao sinal de sangramento devemos ficar atentos pois ele indica que há presença de inflamação na mucosa peri-implantar (15).

O diagnóstico de uma doença peri-implantar leva em consideração a profundidade à sondagem, a presença de sangramento à sondagem e/ou supuração. Além disso radiografias são necessárias para se acompanhar os níveis ósseos ao redor dos implantes (2, 15, 24).

Heitz-Mayfield (2008), sugere que no momento da instalação da prótese sobre implante deva-se estabelecer os critérios que irão servir de base para o acompanhamento clínico do paciente em relação ao aparecimento ou não da doença peri-implantar. Tomadas radiográficas para se estabelecer as condições ósseas devem ser realizadas para futuras comparações em paciente que apresentarem mucosite ou peri-implantite.(42)

Em 2017, no *World Workshop* sobre a classificação da doença periodontal e peri-implantar, foi apresentada uma nova classificação que pudesse abranger maiores aspectos do conceito da peri-implantite. Com isso novos critérios foram adicionados para realizar a correta avaliação da saúde peri-implantar do paciente fornecendo ao clínico uma possibilidade de diagnóstico mesmo sem ter o histórico do paciente. (Quadro 1)

Assim os seguintes critérios de eleição foram propostos:

1. Presença de sinais de inflamação peri-implantares
2. Evidência radiográfica de perda óssea progressiva (2 mm) 1 ano após a instalação da prótese sobre implante
3. Aumento da profundidade de sondagem em comparação com os valores de profundidade à sondagem coletados no período de instalação da prótese.

Caso não haja radiografias do momento da instalação protética para servir como parâmetro de eleição para se configurar a perda óssea progressiva uma tomada radiográfica deve ser realizada e se a perda do nível ósseo ao redor do implante for maior ou igual a 3 mm com sangramento à sondagem e a profundidades de sondagem for igual ou maior do que 6 mm associado a sangramento devemos, assim, diagnosticar o paciente com peri-implantite (2).

Após termos confirmado o diagnóstico de peri-implantite podemos, ainda, classificá-la como leve, moderada e severa de acordo com a profundidade de sondagem, perda óssea e presença de sangramento e supuração. Os casos considerados leves são aqueles que apresentam profundidade à sondagem menores ou iguais a 4mm, sangramento e/ou supuração após uma sondagem suave e perda óssea menor que 25%. Já os casos considerados moderados apresentam profundidade à sondagem maior ou igual a 6mm, sangramento e/ou supuração após uma sondagem suave e perda óssea entre 25 a 50%. São considerados pacientes com casos graves de peri-implantite aqueles que apresentarem profundidade à sondagem maior ou igual a 8mm, sangramento e/ou supuração após uma sondagem suave e perda óssea maior que 50%. (20, 43)

Quadro 2.1 - Definições de saúde e doenças peri-implantares de acordo com o workshop mundial de 2017

	<b>Tecido peri-implantar saudável</b>	<b>Mucosite</b>	<b>Peri-implantite (apresenta prontuário detalhado/ possui acompanhamento)</b>	<b>Peri-implantite (não apresenta prontuário detalhado/ não possui acompanhamento)</b>
<b>Sinais visíveis de inflamação</b>	-	+	+	+
<b>SS com/sem supuração</b>	-	+	+	+
<b>Aumento da PS em relação à visita anterior</b>	-	-	+	≥ 6mm
<b>Aumento da POR desde a remodelação inicial</b>	-	-	+ Remodelação óssea inicial não deve ser ≥ 2mm	≥ 3mm (Medida feita da parte apical até a parte mais coronal da superfície do implante que ainda está imerso em osso)

SS: sangramento à sondagem, PS: profundidade de sondagem, POR: perda óssea visto radiograficamente, (+) presente/ (-) ausente.  
(Adaptado de Kormas et. al., 2020)

#### 2.2.4 Fatores de risco

Para alguns autores, alguns fatores de risco associados à peri-implantite já estão bem estabelecidos na literatura, tais como higiene oral deficiente (23), histórico de periodontite (44) e tabagismo (45). Porém, outros autores apontam que para identificar corretamente os fatores de risco, estudos prospectivos se fazem necessários pois atualmente existem poucos estudos desse tipo e, com isso, apontam alguns fatores como indicadores de risco, ou seja, são fatores associados a doença peri-implantar. Assim, para eles os indicadores de risco identificados das doenças peri-implantares são biofilme, tabagismo, histórico de periodontite, o próprio desenho do implante, a rugosidade da superfície na porção transmucosa, cimento residual, ângulo de emergência maior que 30°, radioterapia, largura do tecido queratinizado, tempo de função do implante, diabetes, sobrecarga oclusal, o consumo de álcool, fatores iatrogênicos e características genéticas. Entretanto, como mencionado, tais indicadores ainda apresentam resultados conflitantes e bem menos estabelecidos entre os autores. (15, 21, 22, 35, 42, 46-48) Além disso não há informações

conclusivas sobre a questão das características da superfície do implante como fator determinante para peri-implantite e, nos poucos estudos que existem, as informações às vezes são contraditórias.

#### Higiene Oral deficiente e histórico de periodontite

A má higiene oral leva ao acúmulo de biofilme o que, conseqüentemente, resultará inicialmente em mucosite e posterior peri-implantite. Além disso é sabido que a peri-implantite é uma infecção polimicrobiana e não associada a um único patógeno específico.

Alguns estudos apontam que as bactérias que colonizaram os tecidos ao redor dos implantes foram transmitidas dos dentes presentes no paciente que possuíam doença periodontal prévia. Outros autores, no entanto, apresentam resultados nos quais os pacientes apresentam bactérias peri-implantares diferentes daquelas encontradas na periodontite, o que pode sugerir que os dois ambientes são diferentes. Os tecidos moles e duros que envolvem o implante e o periodonto apresentam inúmeras diferenças: não há ligamento periodontal na região peri-implantar por causa da osseointegração, e as fibras de colágeno ao redor do implante são dispostas de maneira circunferencial com uma vascularização diminuta quando comparada ao periodonto e com isso a fixação do tecido conjuntivo peri-implantar é mais fraca do que a presente nos dentes (44).

Inúmeros artigos são encontrados na literatura relatando que o histórico de doença periodontal, crônica ou agressiva, ou periodontite ativa está associada a uma maior chance de pacientes desenvolverem a peri-implantite (15, 21, 49). Roos-Jansåker e colaboradores, analisaram 216 pacientes, por um período de 9 a 14 anos após a instalação de implantes, e corroboram para esse entendimento (37). Koldslund e colaboradores também reportaram achados semelhantes quando analisaram 109 pacientes em um período de 1 a 16 anos (46). Faz-se necessário realizar o tratamento da doença periodontal antes que seja realizada a instalação do implante.

## Tabagismo

Estudos apontam a associação entre o tabagismo e a peri-implantite relatando que há um aumento significativo da perda óssea marginal em fumantes em comparação com não fumantes. Assim, o fumo é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de mucosite e peri-implantite (15, 37).

### 2.2.5 Tratamentos

O tratamento das doenças peri-implantares é amplo e com diversos recursos à disposição do especialista. Entretanto, ainda não há um consenso na literatura sobre quais seriam os melhores tratamentos pois os dados obtidos em diversos estudos são muito heterogêneos impossibilitando a afirmação de que um método superaria outro no tratamento da doença. O que se sabe é que o sucesso do resultado dos tratamentos deve incluir parâmetros que descrevam a resolução da inflamação e preservação do osso de suporte. Além disso, por ser uma doença causada por bactérias o alvo dos tratamentos deve visar medidas para eliminá-las. Assim o tratamento da peri-implantite deve se basear no controle de seu principal fator etiológico, o biofilme (50, 51).

As terapias propostas incluem tratamentos mais conservadores ou não-cirúrgicos como a remoção do biofilme da superfície do implante com curetas de titânio ou plásticas, terapias antimicrobianas locais e/ ou sistêmicas (52), jatos com pó abrasivos (53), uso de dispositivos ultrassônicos (54), escovas rotatórias de titânio, uso de laser (55) entre outros e tratamentos cirúrgicos, que consistem na descontaminação da superfície do implante (51), estabelecimento de um tecido peri-implantar saudável com debridamento do defeito ósseo e tecido mole, se necessário, e tornar a anatomia local tal que promova um acesso fácil para a higienização e, quando possível, realizar a regeneração do defeito ósseo. A implantoplastia (56) e o uso de laser de alta potência podem também serem realizados visando o sucesso do tratamento. Essas terapias possuem em comum o objetivo de eliminar a microbiota presente, alterando ou não a superfície do implante, e permitir que as células ósseas

se proliferem novamente produzindo uma re-osseointegração (26). No entanto, apesar do grande número de estudos avaliando diferentes abordagens terapêuticas, o tratamento dessa condição é um desafio para os clínicos e ainda há resultados insatisfatórios a longo prazo, levando, em muitos casos, à necessidade de remoção do implante.

O tratamento não cirúrgico de descontaminação das superfícies dos implantes em combinação com uma higiene oral adequada pode, em alguns casos, ser suficiente para controlar a doença mucosite. Caso haja infecção, o tratamento inicial deve se concentrar, principalmente, em realizar seu controle. Porém à medida que o processo de reabsorção óssea ao redor do implante já se encontra em estágio avançado e a bolsa peri-implantar torna-se cada vez mais profunda, a eficácia dos tratamentos não cirúrgicos diminui. Esses tratamentos podem ser realizados com o objetivo de criar condições mais saudáveis nos tecidos moles peri-implantares para posterior terapia cirúrgica.

O objetivo do tratamento cirúrgico é permitir o acesso ao implante para se realizar o debridamento mecânico e descontaminação química da sua superfície (24). Alguns estudos apontam que o debridamento realizado com retalho, também denominado de procedimento aberto, incluindo a descontaminação da superfície, foi mais eficaz no tratamento da peri-implantite do que o debridamento fechado (15, 51).

O tratamento cirúrgico do tipo aberto inicia-se pela ampla exposição de todo campo cirúrgico. O defeito provocado pela peri-implantite é, na maioria dos casos, do tipo cratera em taça ou circunferencial e com isso é importante que se faça o rebatimento do retalho em ambos os lados, vestibular e lingual/ palatino. Depois da divulsão de todo tecido e o implante sendo visualizado por completo, uma vigorosa curetagem mecânica deve ser realizada a fim de promover a remoção de todo o tecido de granulação. Uma vez removido todo granuloma, a próxima etapa é a de descontaminação da superfície e remoção do biofilme da superfície do implante (22).

#### 2.2.5.1 *Debridamento mecânico com curetas*

O debridamento mecânico com curetas é considerado um procedimento não cirúrgico, podendo ser realizados, preferencialmente, com curetas de titânio, fibras de



carbono, plástico ou teflon. Tais curetas causam poucas alterações na superfície do implante, mas são afiadas e fortes o suficiente para remover depósitos de biofilme calcificados nos implantes. Curetas de aço convencionais ou instrumentos ultrassônicos com pontas de metal causam danos graves na superfície do implante e o tornam propício ao acúmulo futuro de placa, com isso o seu uso deve ser evitado. A curetagem tem se mostrado eficaz para o tratamento de mucosites e com ótimos resultados quando associados à bochechos com antimicrobianos (15, 30, 57). Após o uso de curetas o implante pode ser polido com uma taça de borracha e pedra-pomes ou pó de glicina para que sua superfície fique lisa e sem falhas. Essa característica é de suma importância na prevenção do acúmulo de placa e colonização bacteriana peri-implantar (22).

Entretanto, alguns autores apontam que tais instrumentos podem ser ineficazes para o debridamento da superfície do implante infectado que possui microestruturas e superfícies rugosas. Além disso evidenciaram que o instrumental, que é mais macio que o titânio, pode deixar vestígios podendo ser bem difícil a sua remoção (58). Assim é sugerido que o debridamento mecânico pode resultar melhora do sangramento, mas com limitações quando pensamos em redução da bolsa peri-implantar.

#### 2.2.5.2 Agentes químicos

Inúmeros produtos químicos, em solução ou em gel, são utilizados para realizar a descontaminação do implante infectado ou exposto. Agentes como o ácido cítrico (59), o peróxido de hidrogênio (60), clorexidina, ácido clorídrico, antibióticos, cloraminas e hipoclorito de sódio são algumas das substâncias encontrados na literatura. Entretanto, não há comprovação de que uma substância química seja melhor que a outra (24). Muitos agentes químicos têm sido usados como adjuntos para descontaminação mecânica da superfície do implante, porém, alguns autores relatam mudanças morfológicas perceptíveis e corrosão na superfície do implante e isso pode impedir a re-osseointegração (61).

### 2.2.5.3 Laserterapia

O uso do laser vem ganhando espaço no tratamento da peri-implantite por seu potencial descontaminante sem alteração significativa da superfície do implante quando pensamos em terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). Além disso, o laser de baixa potência promove a modulação da inflamação. Já quando pensamos no laser de alta potência algumas de suas vantagens estão relacionadas a ablação do tecido de granulação presente nos locais da infecção e a hemostasia. Entretanto, existe ainda preocupação em relação aos danos térmicos causados e possíveis alterações morfológicas que podem ocorrer na superfície dos implantes. Além disso a dificuldade maior, quando pensamos nessa modalidade de tratamento, é o acesso e aplicação do laser em toda a superfície do implante e o estabelecimento de protocolos seguros e padronizados (58). Muitos tipos de laser foram descritos para o tratamento da peri-implantite, tais como o laser de Er:YAG, o de CO<sub>2</sub>, o de GaAIs, o de Nd:YAG e o de Er,Cr:YSGG (1).

A descontaminação com o laser é baseada em seu efeito térmico, que desnatura as proteínas e causa necrose celular sendo sua capacidade de descontaminação dose-dependente. Alguns autores apontam o uso seguro e eficaz do laser de Er:YAG, pois ele é capaz de remover a camada superficial de óxido de titânio infiltrada por micro-organismos no implante sem comprometer a sua superfície quando utilizado em parâmetros seguros como o proposto por Manzavi e colaboradores (2014) de 100mJ por 60s (48, 62). No entanto, outros autores demonstraram resultados não tão promissores, em ensaios clínicos com acompanhamento de 4 anos, quando comparado o uso desse laser e a utilização de curetas e solução salina combinados com terapia cirúrgica de remoção/regeneração de lesões peri-implantares avançadas, pois não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos (63).

O laser de CO<sub>2</sub> também é utilizado na desinfecção das superfícies implantares pois é minimamente absorvido na superfície do implante e tem um risco reduzido de causar dano ao tecido induzido pela temperatura quando utilizado dentro de parâmetros adequados. A utilização de um protocolo adequado é crucial para o tratamento para que se evite o superaquecimento e necrose celular (48). Entretanto, para alguns autores os lasers de diodo, CO<sub>2</sub> e GaAIs demonstraram potencial de

descontaminação abaixo do ideal. A capacidade do laser Nd:YAG de descontaminar a superfície do implante ainda é debatida na literatura. O uso do laser sozinho mostrou resultados comparáveis com dispositivos de pó abrasivos sendo assim, a combinação do tratamento mecânico e do laser demonstrou possuir uma capacidade de resolução da peri-implantite maior em comparação com o tratamento mecânico sozinho (1).

A terapia fotodinâmica é uma técnica que utiliza um agente fotossensibilizante que se fixa às bactérias do biofilme e, quando irradiada com laser, produz oxigênio nascente que é citotóxico e capaz de destruir as células bacterianas. A utilização dessa modalidade de tratamento tem gerado muito interesse devido ao seu potencial para descontaminação de superfícies de implantes no tratamento de peri-implantite sem alterar sua superfície (26).

A escolha do laser de diodo para esse trabalho se deu, pois, diversos estudos demonstraram sua eficácia na descontaminação das superfícies dos implantes sem efeitos adversos aos tecidos adjacentes. Entretanto, apesar desses relatos na literatura sobre o seu uso clínico na implantodontia, pouco se sabe sobre os efeitos causados pelos lasers nas superfícies dos implantes. Além disso, considerando que as superfícies de tratamentos dos implantes variam entre seus fabricantes e muitas vezes não temos acesso à todas as etapas de sua produção devido ao sigilo mantido pelas empresas, não há consenso em um tratamento padrão auxiliado por laser para peri-implantite (28).

#### 2.2.5.4 Pó abrasivo

Sabe-se que essa modalidade de tratamento pode causar alterações na superfície resultando em mais ou menos danos a superfície do implante, dependendo do tamanho das partículas abrasivas utilizadas. Os dois produtos mais utilizados são o bicarbonato de sódio e a glicina. A descontaminação da superfície do implante feita com o uso do pó de glicina tende a ser mais suave e levar a menores modificações na superfície de Ti em comparação ao bicarbonato de sódio, especialmente quando os tratamentos são mais prolongados, pois as partículas são aproximadamente 4 vezes menores que as de bicarbonato de sódio, variando de 20 a 60  $\mu\text{m}$  (64).

#### 2.2.5.5 Implantoplastia

Outra técnica encontrada na literatura é a implantoplastia ou plastia por brocas. Essa manobra visa remover mecanicamente a rugosidade presente na superfície do implante que não possui osso ao seu entorno, ou seja, implantes em pacientes com peri-implantite e que possuem espiras expostas. Ela permite otimizar a manutenção e facilitar a higiene bucal do paciente pois torna a superfície do implante lisa e isso dificultaria a adesão bacteriana (26) podendo ser realizado com brocas diamantadas e instrumentos de polimento com irrigação abundante.

Alguns autores relataram que a combinação entre o debridamento cirúrgico e a implantoplastia leva a um tratamento clínico e imagens radiográficas superiores quando comparados apenas aos tratamentos cirúrgicos de remoção do granuloma (65). Romeo e colaboradores apresentaram 100% de sobrevida de implantes após 3 anos do procedimento realizado, com melhora dos parâmetros clínicos e radiológicos em comparação com aqueles sem implantoplastia (56). Para El Chaar e colaboradores a implantoplastia foi melhor sucedida do que os tratamentos com pó abrasivo, escovas de titânio, laser de Er: YAG e agentes químicos na remoção de detritos biológicos da superfície do implante (66).

As propriedades da superfície do implante podem ser divididas em topográficas, químicas e propriedades mecânicas e físicas. Tais fatores irão interagir entre si e por conta disso é muito difícil avaliá-los separadamente. Com isso se alterarmos a topografia da superfície com um tratamento para peri-implantite, por exemplo, as propriedades químicas e físicas também terão maiores probabilidades de serem modificadas no implante. Tendo tal conceito em mente podemos pensar então que nossos tratamentos para peri-implantite podem ter um impacto direto na formação óssea ao redor desse implante (67).

Sabemos que cinco fatores são essenciais para a osseointegração: o desenho do implante ou sua macro geometria, a composição do implante ou o material do qual ele é formado, propriedades ou tratamentos de superfície, ou seja, sua micro geometria, a qualidade do osso e a técnica cirúrgica em si. Entre as propriedades da superfície ou os tratamentos recebidos temos que a topografia criada ou rugosidade, a estrutura química, a carga e a molhabilidade são fundamentais para osseointegração. Alterações no tratamento de superfície do implante são propostas para levar a um melhor resultado clínico e histológico, e isso resulta diretamente em alteração no comportamento celular e na formação de biofilme (29).

Atualmente, está bem estabelecido na literatura que a modificação na superfície dos implantes para torná-los mais rugosos pretende acelerar o processo de reparo ósseo por meio da estimulação da diferenciação, do crescimento e da fixação das células ósseas, a fim de fornecer uma estabilidade primária mais adequada permitindo, assim, um carregamento de carga oclusal o mais breve possível. A rugosidade obtida em escala micrométrica ( $\mu\text{m}$ ) pretende fornecer um melhor travamento biomecânico, já a rugosidade nanométrica (nm) visa fornecer mais locais de adesão para as proteínas do sangue e fluidos intersticiais, como fibrinogênio, vitronectina, fibronectina e albumina, que são adsorvidos dinamicamente na superfície do implante (Efeito Vroman) em segundos, formando uma matriz superficial transitória, potencializando o processo de consolidação óssea (67, 68). Mais recentemente, foi sugerido que o grau de rugosidade pode interferir na atividade desempenhada pelas células, uma vez que as superfícies de titânio que apresentam rugosidade moderada induzem células para um fenótipo pró-cura, enquanto uma maior rugosidade leva a ativação inflamatória (69-71).

Como é realizada em detalhes essa rugosidade na superfície dos implantes permanece, em muitos casos, não divulgado pelas empresas, mas já é sabido que os principais métodos são feitos por meio de ataque ácido, jato de areia, pulverização de plasma de titânio e revestimento com hidroxiapatita (HA). Além desses métodos também podemos encontrar a biofuncionalização de superfícies de implantes que é feita pela adição de diferentes substâncias para melhorar suas características biológicas (3, 9).

A colonização, a estrutura e a composição do biofilme nas superfícies dos implantes também podem ser influenciadas pela rugosidade da sua superfície, além de sua composição química e propriedades hidrofóbicas apresentadas. Modificações na micro e nano-topografia dos implantes foram projetadas para melhorar o contato osso-implante, mas o acúmulo de biofilme em superfícies mais ásperas é acelerado quando as roscas do implante ficam expostas para a cavidade bucal, o que torna essas áreas mais difícil de descontaminá-lo (29, 72). Sabe-se que é imprescindível dar condições adequadas para se obter a re-osseointegração

Ao se realizar tratamentos para peri-implantite nos implantes estamos sujeitos a promover alterações em suas superfícies. As características promovidas pelas empresas naquela superfície podem ser alteradas e isso poderia acarretar prejuízos ou dificuldades de se promover a re-osseointegração pelas células. E sabemos que para obter um implante longo os mesmos devem ter uma superfície ideal (68).

### 2.3 SAOS-2

A utilização de linhagens celulares osteoblásticas estabilizadas para a realização de experimentos proporcionou melhor entendimento do funcionamento da biologia óssea como a avaliação da regulação da diferenciação celular, síntese e secreção de proteínas da matriz, mecanismos moleculares de doenças ósseas, ação de drogas, entre outros. Desde a primeira tentativa de isolamento e cultura *in vitro* de células osteoblásticas de osso humano adulto (73) até os tempos atuais muito se tem alcançado com experimentos celulares (74).

Atualmente, além de avaliar as funções regulatórias de uma célula, também, se torna importante avaliar sua interação com diversos biomateriais disponíveis para diferentes fins na área da saúde e com isso experimentos que avaliem o comportamento da célula em contato com um determinado tipo de material tais como citotoxicidade e potencial de diferenciação são de suma importância. Com isso novos modelos de cultura celular foram empregados além de incluir tipos celulares de diferentes espécies, osteoblastos provenientes de células-tronco pluripotentes, células imortalizadas e células de origem de lesões malignas (74).

A SAOS-2 é uma linhagem celular derivada de osteossarcoma humano que foi retirado de uma menina caucasiana, de 11 anos de idade, em 1975 (74). Esse tipo celular exibe características fenotípicas semelhantes aos osteoblastos maduros, incluindo a deposição de colágenos dos tipos I e V. Menores quantidades de cadeias de colágeno XI também foram detectadas em estudo (75). Possuem altos níveis de atividade da fosfatase alcalina exibindo uma limitada capacidade de resposta a alguns hormônios esteroidais (76), conseguem formar uma matriz calcificada semelhante à encontrada no tecido ósseo (77), expressão de citocinas e fatores de crescimento semelhantes à célula original (78).

As células malignas, frequentemente, expressam características diferenciadas do tecido de origem e apresentam imortalidade celular. Estas propriedades tornam possível estabelecer linhagens celulares com fenótipo e funções celulares passíveis de ser estudadas (77). Além disso, esse tipo celular possui como vantagens fácil cultivo celular, um número ilimitado de células disponíveis sem a necessidade de isolamento demorado ou aprovação ética e uma reprodutibilidade mais confiável. Entretanto, tais células não apresentam todas as características fenotípicas de uma célula osteoblástica original e possuem como desvantagem uma proliferação que não é fisiológica, visto que os mecanismos de inibição de contato e outros processos relacionados à divisão celular são alterados (74, 78).

Saldaña e colaboradores realizaram um estudo comparativo entre células primárias de osteoblastos e diferentes linhagens derivadas de osteossarcoma e como tais células se comportavam frente ao contato com esferas de titânio puro e discos de liga de titânio e relataram que dentre as linhagens estudadas (MG-63, Saos-2 and U-2) as células Saos-2 apresentaram as melhores condições e mimetizaram muitas das funções exercidas pelas células primárias e que elas podem ser usadas como representantes das células primárias de osteoblastos em diversos experimentos (79).

Assim, com o auxílio de diversos estudos, conseguimos determinar a alta correlação no perfil de expressão entre as culturas de células de osteoblastos humanos primários e as linhagens de células de osteossarcoma (SAOS-2). Indicando que esse tipo celular desempenha um papel útil quando utilizado como modelo para a análise molecular da regulação de genes associados à função de osteoblastos (78).





### 3 PROPOSIÇÃO

Avaliar as respostas celulares da linhagem SAOS-2 crescidas em superfícies de Ti com adição de nano-hidroxiapatita (NANO) e duplo ataque ácido (DAA) modificadas por diferentes tipos de plastia de superfície para o tratamento da peri-implantite.

#### **Objetivos específicos:**

- Caracterização das diferentes superfícies de Ti NANO e DAA tratadas por plastia com brocas, plastia com pó abrasivo e plastia por laser;
- Avaliação da morfologia e proliferação celular da SAOS-2 crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti NANO e DAA tratadas por plastia com brocas, plastia com pó abrasivo e plastia por laser;
- Avaliação da diferenciação celular da SAOS-2 crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti NANO e DAA tratadas por plastia com brocas, plastia com pó abrasivo e plastia por laser.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CAAE 25140619.6.0000.0075). Os experimentos foram realizados no laboratório de Pesquisa Básica – Edmir Matson do Departamento de Dentística da FOU SP.

### 4.1 Tratamentos de Superfície

Foram utilizados 528 discos de Ti (titânio tipo IV) de 2 mm de altura e 6 mm de diâmetro, sendo 264 de superfícies com adição de nano-hidroxiapatita (NANO) e 264 de superfície duplo ataque ácido (DAA) (S.I.N. – Sistema de Implante, São Paulo, Brasil) submetidos a um dos tratamentos descritos a seguir (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento de superfície

Grupos Experimentais	Tratamento de Superfície
Controle	Sem tratamento (132 discos, sendo 66 NANO e 66 DAA)
NANO pó	Plastia por pó - jateamento
DAA pó	(66 discos) Plastia por pó - jateamento (66 discos)
NANO Imp	Plastia por broca - implantoplastia (66 discos)
DAA Imp	Plastia por broca - implantoplastia (66 discos)
NANO Laser	Plastia por laser (66 discos)
DAA laser	Plastia por laser (66 discos)

#### 4.1.1 Plastia por pó

Os discos de Ti foram jateados utilizando um sistema abrasivo de ar (Ultrassom Jet Sonic BP – Gnatius Equipamentos Médico-Odontológicos, Brasil) composto por água corrente com pó de aminoácido glicina (Clinpro™ Prophy Powder da 3M ESPE, EUA). Foram realizados movimentos de vai-e-vem perpendiculares à superfície do disco, sem o contato entre a ponta do jato e a superfície, por toda a superfície do disco, por 30s, seguido de lavagem com solução salina para remoção de todo pó.

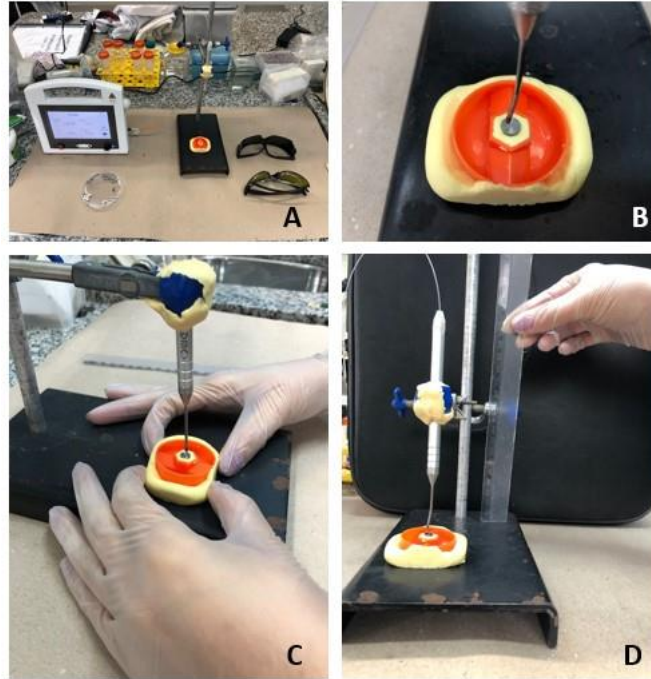
#### 4.1.2 Plastia por brocas

Os discos de Ti foram desgastados com brocas diamantadas (Ponta Diamantada 4138 – Fava, São Paulo, Brasil) montadas em alta rotação, com refrigeração abundante, posicionadas paralelamente ao disco com movimentos de vai-e-vem por toda a superfície do disco, por 30s. A cada 10 discos a broca foi trocada. Em seguida foi realizado a lavagem com solução salina para remover quaisquer partículas.

#### 4.1.3 Plastia por laser

Os discos de Ti foram irradiados com laser de diodo de alta potência (Thera Lase Surgery, DMC, Brasil) no comprimento de onda de 980 nm. Uma fibra de 200 mm foi empregada e o tratamento com laser foi realizado em onda contínua com potência irradiada de 2W por 30s, 60J de energia. O ângulo de irradiação foi 90° e a distância entre a ponta do diodo e a superfície foi mantida constante entre 1 – 2 mm. (80, 81)

Figura 4.1 – Disposição do dispositivo criado para manter o padrão de uso do laser nos discos de titânio. **A** – Disposição da mesa de trabalho e materiais utilizados. **B e C** – Confeção de dispositivo utilizando plástico e silicone de adição para a estabilização dos discos e posicionamento adequado para criar uma padronização no procedimento. **D** – Estabilização da ponta do laser para que o mesmo sempre estivesse posicionado a mesma distância em todos os discos.



Fonte: A autora.

Após os diferentes tratamentos realizados na superfícies dos discos e previamente à utilização nos experimentos de cultivo celular, todos os discos foram esterilizados com radiação gama.

#### 4.4 Caracterização de superfície dos discos de Ti

As características topográficas da superfície dos discos sem células foram avaliadas qualitativamente por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV) de emissão de campo. As amostras foram fixadas em fita de carbono dupla face especial para a técnica e o microscópio eletrônico de varredura utilizado foi o modelo Stereoscan 440 (Leo 430 SEM, Leo Ltda., Inglaterra) operado a 20 kV, com

magnificação de 1000x, 5000x, 10000x, 20000x, 40000x e 80000x no Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT) do departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

As características topográficas da superfície dos discos com células foram avaliadas qualitativamente por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV) de emissão de campo. As amostras foram metalizadas com carbono usando-se metalizador (Coating System - Bal-tec, modelo SCD-050). O processamento das amostras em ponto crítico (Secador automático de ponto crítico - LEICA EM CPD 300- Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) e a metalização seguiram o protocolo padrão empregado na preparação de amostras para análise em MEV. Após, foram fixadas em fita de carbono dupla face especial para a técnica e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 440, Zeiss) operado a 20 kV, com magnificação variando de 500x a 1500x, no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem - CADI na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

#### **4.5 Obtenção e cultura de SAOS-2**

Células osteoblásticas humanas imortalizadas da linhagem SAOS-2 (HTB-85™) foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e doadas pelo Prof. Dr. Lucas Novaes Teixeira da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic. Elas foram descongeladas e transferidas para tubos de centrífuga contendo 10 mL de McCoy's 5A (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e as células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated, Costar, Corning, Nova York, NY, EUA) contendo 20mL de McCoy's 5A (Sigma) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen, Grand Island, Nova York, NY, EUA), 1% de penicilina (Invitrogen) e estreptomicina (Invitrogen). Na subconfluência, foi removido o meio de cultura e adicionada solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão de células. Em seguida, foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células/poço em placas de poliestireno de 48 poços (Corning Incorporated) e cultivadas em McCoy's 5A (Sigma) suplementado com 10% de soro

fetal bovino (Gibco), e 1% de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma) e ácido ascórbico (Gibco), além de 1% de penicilina (Invitrogen) e estreptomicina (Invitrogen). A progressão das células foi avaliada em microscópio de fase invertido (Axiovert 25, Zeiss, Jena, Alemanha). O meio de cultura era trocado a cada 2 ou 3 dias. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico.

## 4.6 Avaliação das respostas celulares

### 4.6.1 Adesão e morfologia celular

A adesão das células crescidas sobre as superfícies dos discos de Ti foi analisada por MEV após 24h e 72h. Para tanto, os discos foram fixados em solução de glutaraldeído 2% em tampão cacodilato 0,2 M. As placas contendo os discos com as células foram refrigeradas por pelo menos 24h e após foram desidratados e levados ao ponto crítico para secagem. Posteriormente, as amostras foram fixadas nos *stubs* com fita de carbono dupla face e analisadas por meio de MEV (MEV, Leo 430 SEM, Leo Ltda., UK) e as imagens capturadas nos aumentos variando entre 500x e 1500x (82).

### 4.6.2 Viabilidade celular e curva de crescimento

Os padrões de proliferação foram analisados quantitativamente utilizando os resultados da análise da atividade mitocondrial das células submetidas ao teste de redução do MTT – do inglês, *Thiazolul blue tetrazolium bromide*. (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl); -2,5-difeniltetrazólio - Invitrogen/Gibco). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em formazan insolúvel (83).

Após 1, 3 e 5 dias de cultivo, as células foram incubadas em meio de cultura contendo MTT (5 mg/mL) por 4h (Sanyo Electric Co., OS, Japão). Em seguida, a

solução de MTT foi removida e adicionados 250µL de isopropanol ácido (100mL de isopropanol em 134µL de ácido clorídrico a 0,04M – Merck) e a placa de cultura foi mantida em um agitador de placas (Lab-Line Instruments, IL, EUA) por 10 min. Alíquotas de 150µL da solução foram transferidas para uma nova placa de 96 poços (Corning) e a concentração foi determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro (µQuant, Biotek, NY, EUA) com filtro de 570 nm. Os dados foram expressos como absorbância subtraindo-se os valores obtidos da leitura dos discos mantidos às mesmas condições, mas sem células. Os dados foram obtidos em triplicata (n=3).

#### 4.6.3 Quantificação da atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)

Aos 7, 10 e 12 dias de cultivo, a atividade de ALP foi avaliada seguindo protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Brasil). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e os testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato e 500 µL de tampão. No tubo padrão foram acrescentados 50 µL da solução padrão. Os poços contendo células/ discos foram incubados com 0,5mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma-Aldrich). Ao final de 30 min, a solução contida em cada poço foi homogeneizada e 50 µL do lisado foram transferidos para os tubos de ensaio previamente aquecidos em banho maria a 37 °C e os tubos permaneceram por mais por 10 min em banho maria. Após esse período foram adicionados em cada tubo (branco, padrão e testes) 2 mL do reagente de cor. Alíquotas de 150 µL da solução de cada tubo foram transferidas para placas de 96 poços (Corning) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 590 nm em espectrofotômetro µQuant (BioTek).

A atividade de ALP foi calculada a partir da medida do tubo padrão, normalizada pela quantidade de proteína total e expressa como µmol de timolftaleína/h/mg de proteína. (84) Após, 250µL do mesmo lisado utilizado para a quantificação da atividade da fosfatase alcalina foi transferido para tubos de ensaio, misturado com 250 µL de solução de *Lowry* (Sigma-Aldrich, EUA) e mantido em



repouso à temperatura ambiente por 20min. Após esse período, foi adicionado a cada tubo 125 µL da solução de reagente defenol de *Folin e Ciocalteu's* (Sigma-Aldrich) e mantidos em temperatura ambiente por mais 30 min. Em seguida, 150 µL foram retirados e colocados em placas de 96 poços e a absorbância foi lida no espectrofotômetro utilizando-se o comprimento de onda de 680 nm e a concentração de proteína total (mg/mL) de cada poço foi calculada a partir de uma curva padrão feita com albumina bovina (Sigma-Aldrich). Os dados, obtidos em triplicata (n=3), foram expressos por absorbância calculada como descrito anteriormente e expressos em µmol de timolftaleína/h/mg de proteína.

#### 4.6.4 Formação de nódulos de matriz extracelular mineralizada

Após 12 e 15 dias de cultivo, os discos contendo as células foram submetidos ao ensaio com vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich), para detecção e quantificação de nódulos mineralizados. O vermelho de alizarina cora áreas ricas em cálcio e é usado para visualizar precipitações de cálcio nas células.

O meio de cultura foi removido por completo, os poços lavados com PBS aquecido a 37°C e as células aderidas foram fixadas em 1mL de solução de formalina 10% por 24h. Em seguida, foi retirado todo conteúdo dos poços com uma pisseta e as células foram submetidas a desidratação em séries crescentes de álcoois e deixadas para secar à temperatura ambiente por 24 h. Com as placas completamente secas, os discos foram imersos em 1mL de solução de vermelho de alizarina S a 2%, pH 4,2 por 10 min em temperatura ambiente. Posteriormente, o conteúdo foi retirado por completo e os poços lavados com água destilada e deixados para secar. O precipitado de cálcio presente foi corado em vermelho, revelando nódulos de mineralização, que foram examinados por meio de uma análise qualitativa e quantitativa.

Para a análise qualitativa, os discos foram removidos dos poços e fotografados por câmera fotográfica digital para identificação da intensidade de vermelho da reação final do corante em cada grupo. A análise quantitativa, foi realizada por extração de cálcio (85). A cada poço foi adicionado 140  $\mu\text{L}$  de ácido acético (Acros Organics) a 10% e mantidos à temperatura ambiente por 30 min, sob agitação suave. Após esse período, a solução de cada poço foi homogeneizada e transferida para tubos de 1,5 mL. Os tubos foram incubados a 85 °C por 10 min e transferidos por 5 min para recipiente contendo gelo para parar o aquecimento. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 20 min. Sobrenadantes de 100  $\mu\text{L}$  foram transferidos para uma placa de 96 poços (Corning). Em seguida, foi adicionado 40  $\mu\text{L}$  de hidróxido de amônia 10% (Reagen, PR, Brasil) em cada poço para neutralizar o ácido. O volume final do sobrenadante foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro  $\mu\text{Quant}$  (BioTek) em comprimento de onda de 405 nm. Os dados, obtidos em triplicata ( $n=3$ ), foram expressos por absorbância.

#### **4.7 Análise estatística**

Os dados estatísticos foram obtidos para cada experimento empregando o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc, CA, EUA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade para avaliar a aderência à curva normal e posteriormente comparados utilizando a análise ANOVA com um ou dois fatores, seguidos pelo teste de Student Newman-Keuls, quando necessário, e o nível de significância adotado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

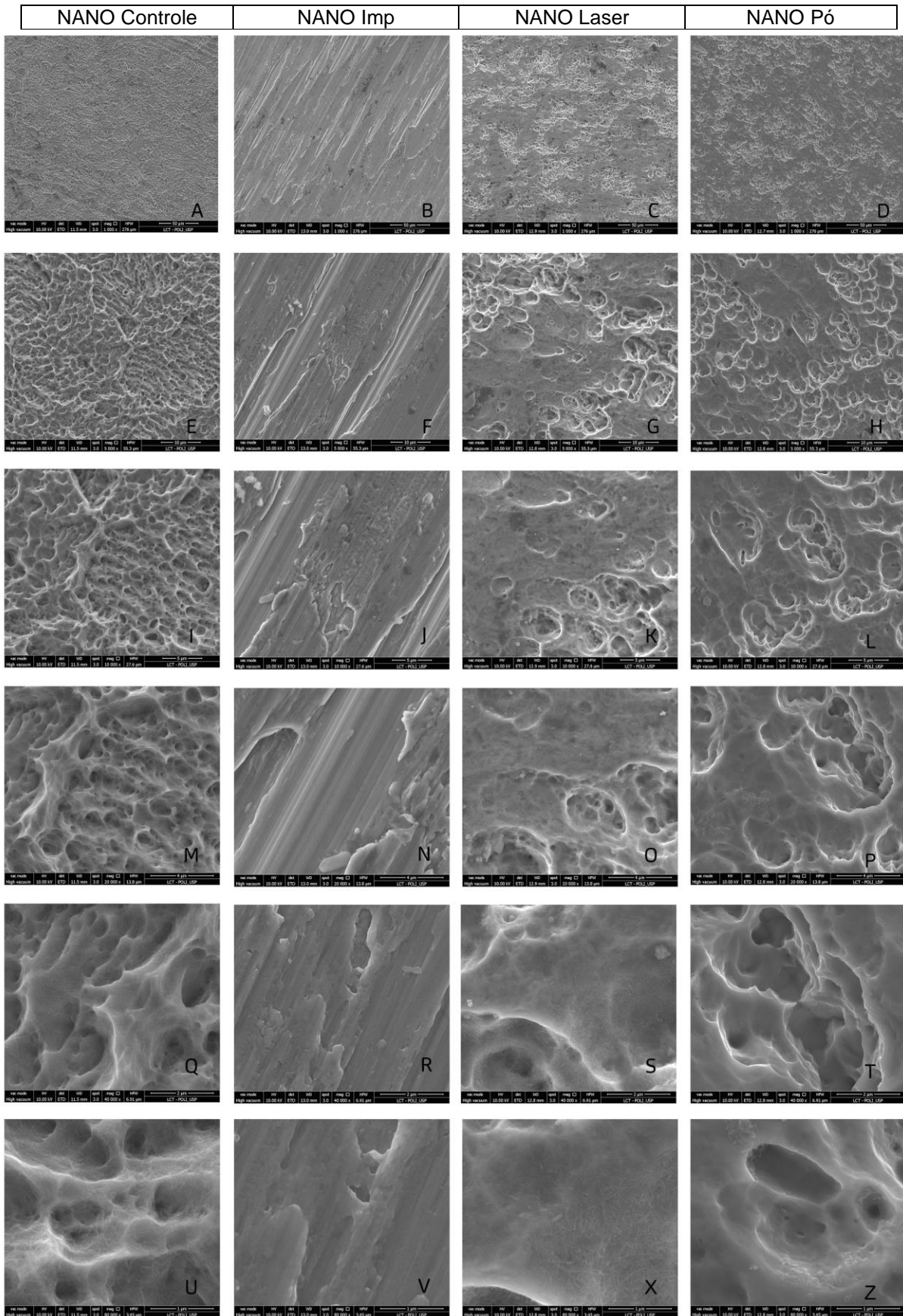
### 5.1 Caracterização de superfície dos discos de Ti

Os discos controle – NANO Controle (Figuras 5.1 A, E, I, M, Q, U) foram avaliados conforme fornecidos pelo fabricante, revelando a sua estrutura em nanoescala. A morfologia da superfície dessas amostras era irregular, com cristas e bordas afiadas, porém sem picos muito altos. Em maiores magnificações (80000x), observamos que existiam inúmeras estruturas fusiformes impregnadas na superfície caracterizando a nano topografia (Figura 5.1 U).

Os discos NANO Laser (Figuras 5.1 C, G, K, O, S, X) e NANO Pó (Figuras 5.1 D, H, L, P, T, Z) apresentaram alterações na morfologia da superfície consistindo em arredondamento das arestas. A superfície NANO Laser ainda apresentou as estruturas fusiformes em sua superfície, isso não ocorreu nos demais grupos e não encontramos sinais de fusão devido ao aumento de temperatura. A superfície NANO Pó apresentou, em maior magnificação (Figura 5.1 Z), estruturas que possuem aspecto de sujidade o que poderia ser remanescente de pó de glicina ou alteração na superfície dos discos. As amostras de discos NANO Imp (Figuras 5.1 B, F, J, N, R, V) apresentaram alterações macroscópicas, como arranhões grosseiros e remoção completa da superfície Nano. No maior aumento (Figura 5.1 V), observamos que essas alterações foram caracterizadas por porções de titânio polido e delaminações.



Figura 5.1 – Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos discos de titânio das superfícies modificadas por nanotopografia (NANO A,E,I,M,Q,U), NANO modificadas por implantoplastia (NANO Imp B, F, J, N, R, V)) NANO modificadas por laser (NANO Laser C, G, K, O, S, X) e NANO modificadas por pó abrasivo (NANO Pó D, H, L, P, T, Z). A-D: 1.000x (Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ ); E-H: 5.000x (Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ ); I-L: 10.000x ( Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$ ); M-P: 20.000x (Barra de escala: 4  $\mu\text{m}$ ); Q-T: 40.000x (Barra de escala: 2  $\mu\text{m}$ ) e U-Z: 80.000x (Barra de escala: 1  $\mu\text{m}$ )



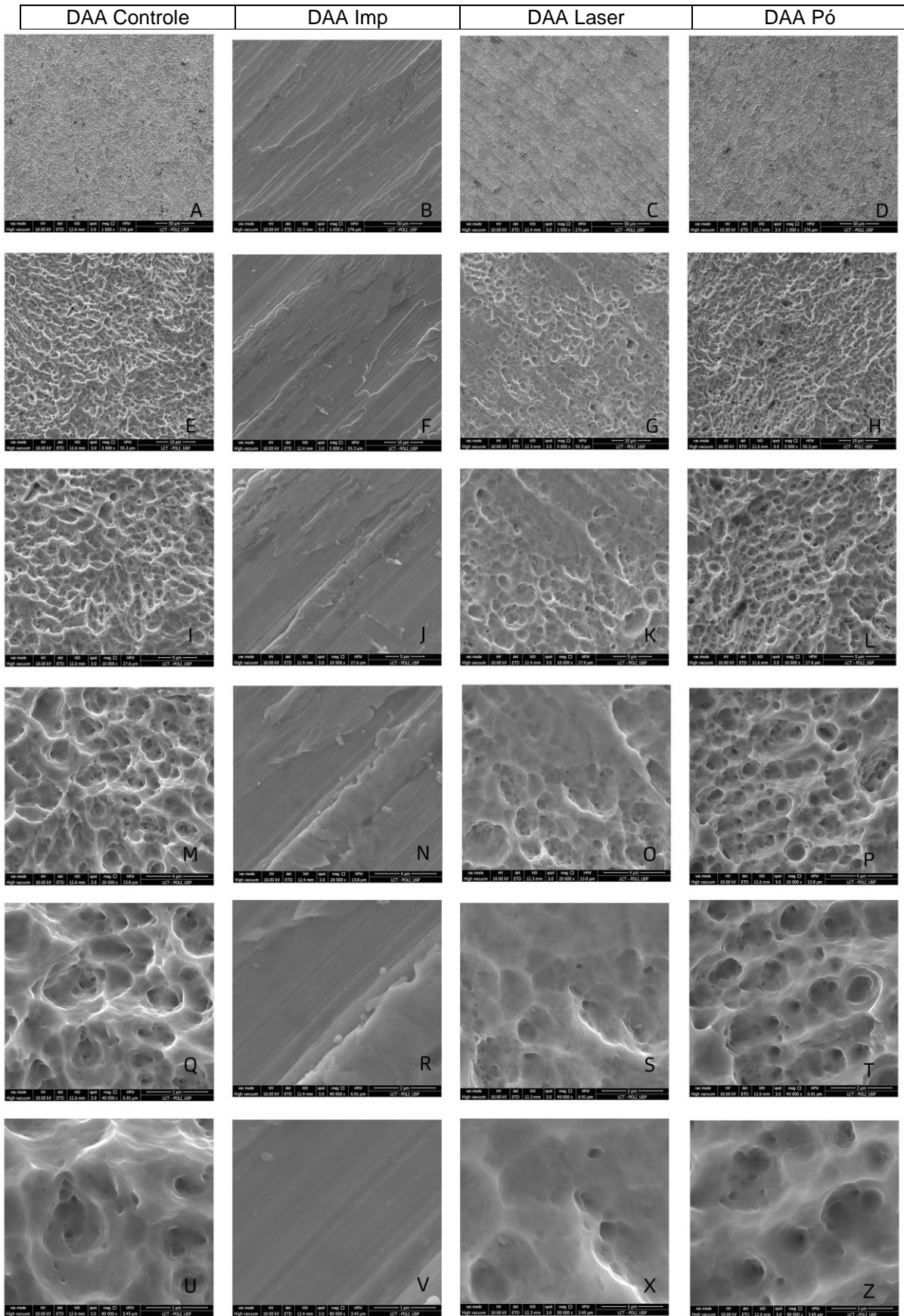
Fonte: A autora.

Os discos DAA Controle – DAA (Figuras 5.2 A, E, I, M, Q, U) foram avaliados conforme fornecidos pelo fabricante, revelando a sua estrutura em microescala. A morfologia dessa superfície se apresentou semelhante aos discos NANO com superfície irregular, possuindo cristas e bordas afiadas, porém sem picos muito altos. Não há estruturas fusiformes, em maiores magnificações. Os discos DAA Laser (Figuras 5.2 C, G, K, O, S, X) apresentaram pequenas alterações na morfologia da superfície consistindo em diminuição das arestas e, também, não encontramos sinais de fusão devido ao aumento de temperatura. A superfície DAA Pó (Figuras 5.2 D, H, L, P, T, Z) foi a que apresentou a menor alteração em sua superfície, permanecendo muito semelhante ao Controle com pequenos arredondamentos nas arestas. Em maior magnificação (Figura 5.2 Z), estruturas que possuem aspecto de sujidade o que poderia ser remanescente de pó de glicina ou alteração na superfície dos discos também foram encontradas. As superfícies dos discos DAA Imp (Figuras 5.2 B, F, J, N, R, V) apresentaram alterações significativas, como arranhões grosseiros e remoção completa da superfície DAA. No maior aumento (Figura 5.2 V), observamos que essas alterações foram caracterizadas por porções de titânio polido e delaminações.





Figura 5.2 – Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos discos de titânio das superfícies modificadas por duplo ataque ácido (DAA) (DAA A, E, I, M, Q, U), DAA modificadas por implantoplastia (DAA Imp B, F, J, N, R, V)) DAA modificadas por laser (DAA Laser C, G, K, O, S, X) e DAA modificadas por pó abrasivo (DAA Pó D, H, L, P, T, Z). A-D: 1.000x (Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ ); E-H: 5.000x (Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ ); I-L: 10.000x (Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$ ); M-P: 20.000x (Barra de escala: 4  $\mu\text{m}$ ); Q-T: 40.000x (Barra de escala: 2  $\mu\text{m}$ ) e U-Z: 80.000x (Barra de escala: 1  $\mu\text{m}$ )



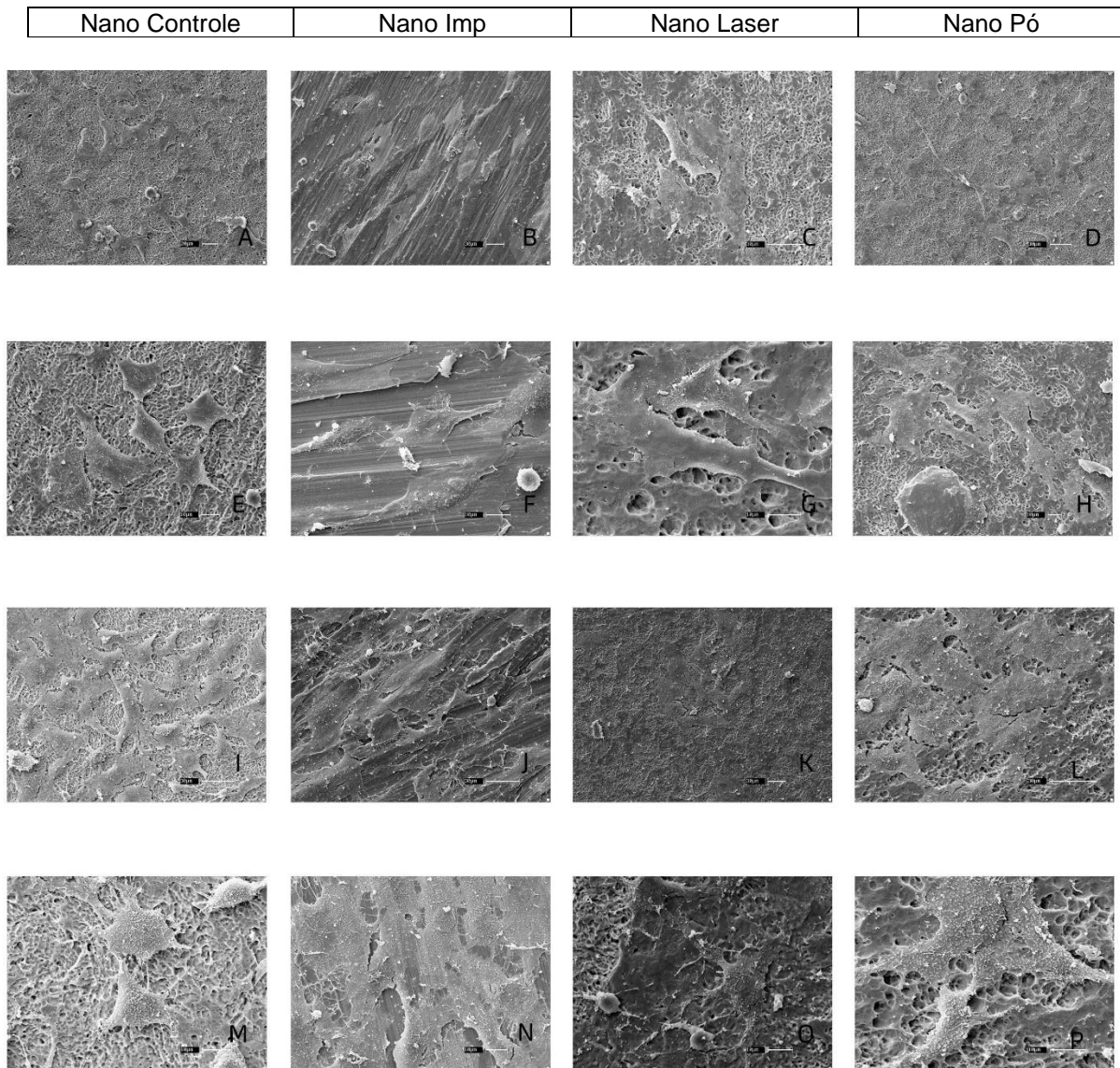
Fonte: A autora.

## 5.2 Avaliação das respostas celulares

### 5.2.1 Adesão e morfologia celular

Independente da superfície avaliada, as células apresentaram fenótipos semelhantes. Após 24h, as células apresentaram extensões citoplasmáticas e filopódios. As células crescidas sobre os discos NANO Controle (Figuras 5.3 A, E, I, M) apresentaram-se ligeiramente mais arredondadas e menores quando comparada aos demais grupos. Após 72h, as células encontravam-se aderidas aos discos de Ti de forma regular em todos os grupos, espalhando-se pela superfície com formato poligonal e espreado, e maiores nos grupos com tratamentos para peri-implantite. As células crescidas nas superfícies NANO Controle mantiveram forma mais arredondada. Destacar às células cultivadas sob superfícies NANO Imp (Figuras 5.3 B, F, J, N) que apresentaram uma morfologia mais alongada quando comparado aos demais grupos, e sua orientação seguiam as ranhuras das delaminações criadas pela broca. Os aumentos variaram de 500x a 1500x.

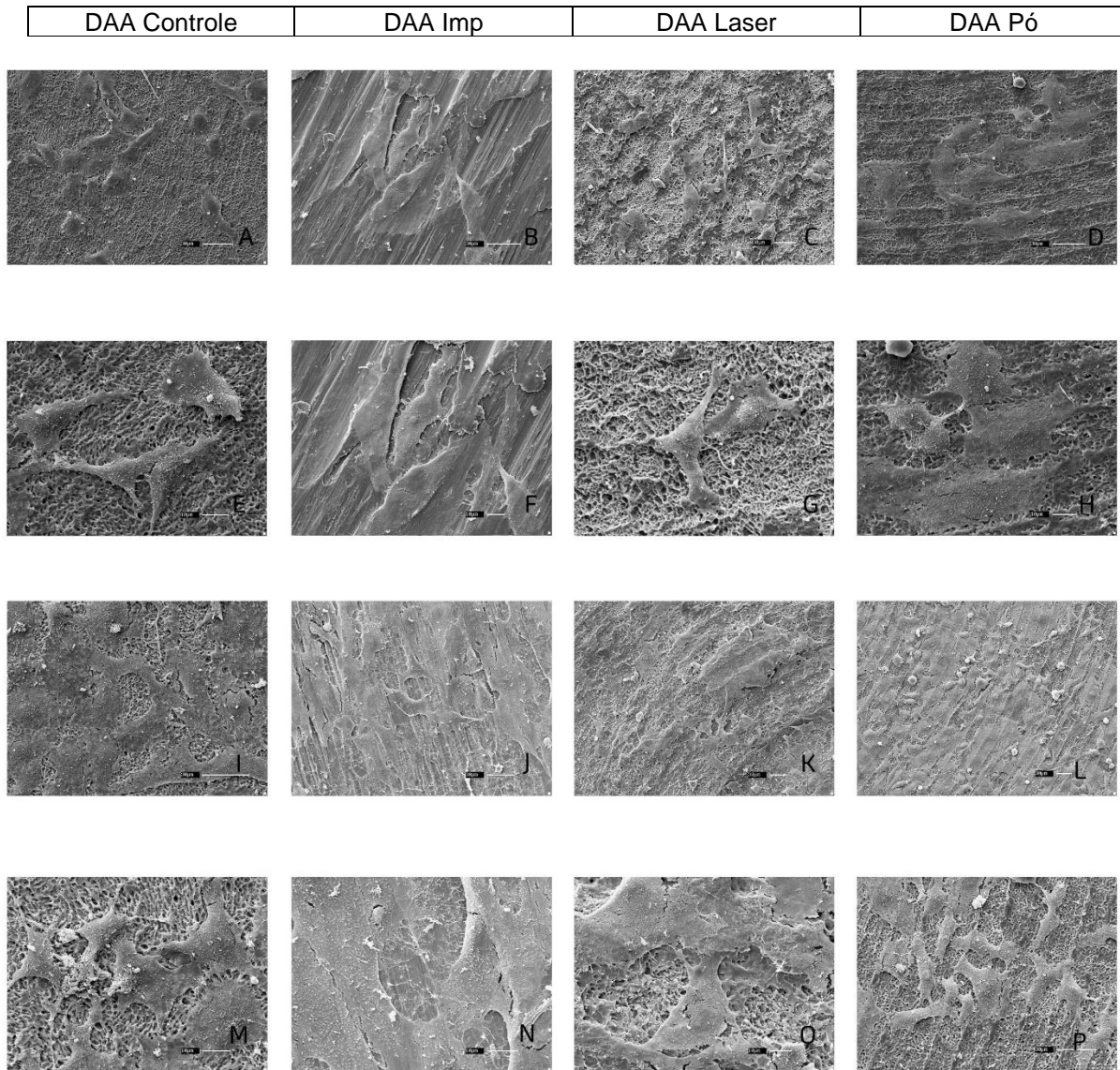
Figura 5.3 – Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (NANO), NANO modificadas por implantoplastia (NANO Imp), NANO modificadas por laser (NANO Laser) e NANO modificadas por pó abrasivo (NANO Pó). A-D: barra de escala: 30  $\mu\text{m}$ , com 24h de cultivo celular, E-H: barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ , com 24h de cultivo celular, I-L: barra de escala: 30  $\mu\text{m}$ , com 72h de cultivo celular, M-P: barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ , com 72h de cultivo celular



Fonte: A autora.

Aspectos morfológicos semelhantes foram encontradas nas células crescidas sobre a superfície DAA. Após 24h, a morfologia celular era, predominantemente, achatada com extensões citoplasmáticas e filopódios. As células crescidas sobre os discos DAA Controle (Figuras 5.4 A, E, I, M) também apresentaram uma discreta forma mais arredondada e menor quando comparada aos demais grupos. Após 72h, as células apresentaram-se regularmente aderidas nos discos em todos os grupos, se espalhando pela superfície dos discos e apresentando forma poligonal, espreiadas com tamanhos ampliados nos grupos com tratamentos. As células crescidas nas superfícies DAA Controle mantiveram forma mais arredondada. Como foi observado no grupo NANO, as células cultivadas sob superfícies DAA Imp (Figuras 5.4 B, F, J, N) apresentava-se mais alongadas quando comparado aos demais grupos, e sua orientação seguia as ranhuras das delaminações criadas pelo tratamento. Os aumentos variaram de 500x a 1500x.

Figura 5.4 – Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com duplo ataque ácido (DAA), DAA modificadas por implantoplastia (DAA Imp), DAA modificadas por laser (DAA Laser) e DAA modificadas por pó abrasivo (DAA Pó). A-D: 1.000x (Barra de escala: 30  $\mu\text{m}$ ) com 24h de cultivo celular, E-H: barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ , com 24h de cultivo celular, I-L: barra de escala: 30  $\mu\text{m}$ , com 72h de cultivo celular, M-P: barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ , com 72h de cultivo celular.



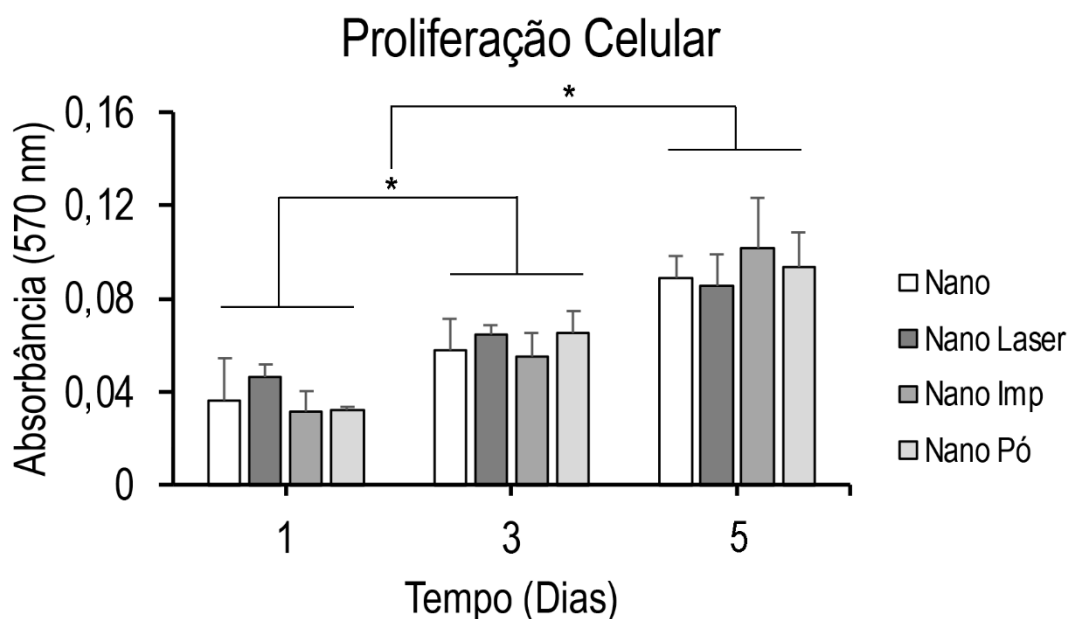
Fonte: A autora.

### 5.2.2 Efeito dos diferentes tratamentos na superfície de ti NANO

Os resultados serão apresentados primeiramente comparando os diferentes tratamentos para peri-implantite propostos (laser, implantoplastia e pó abrasivo) entre si e verificando seus efeitos para cada superfície (NANO e DAA). Em seguida, os resultados apresentados serão a análise de cada modalidade de tratamento para peri-implantite independente da superfície utilizada para que se analise se os tratamentos podem resultar em diferentes respostas celulares na dependência do tipo de superfície de Ti.

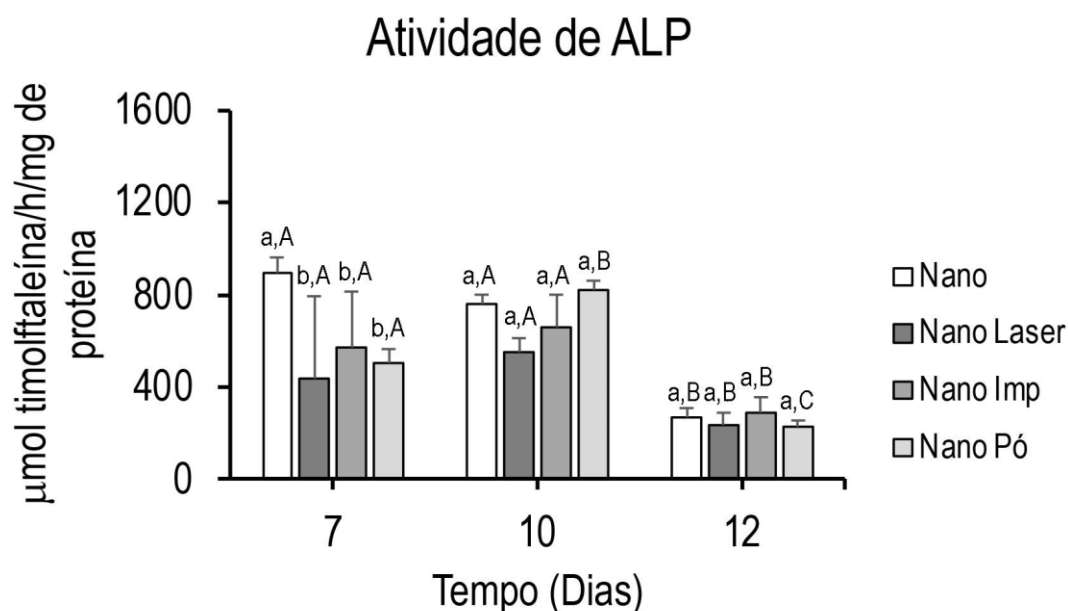
A proliferação celular não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos e na interação grupo-tempo (ANOVA 2 fatores,  $p=0,384$  e  $p=0,156$ , respectivamente). Por outro lado, nota-se diferença entre os grupos experimentais em relação ao tempo com aumento da proliferação de 1 para 3 e 5 dias ( $p < 0,001$ ) (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (NANO), NANO modificadas por laser (NANO Laser), NANO modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e NANO modificadas por pó abrasivo (NANO Pó), por 1, 3 e 5 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos (\*) representam as diferenças estatisticamente significantes entre os tempos experimentais, independentes dos grupos (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04)



A atividade de ALP apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, tempos e na interação grupo-tempo (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  e  $p = 0,017$ , respectivamente). Aos 7 dias, nota-se maior atividade da ALP nas células do grupo NANO Controle comparado aos grupos NANO Laser, NANO Imp e NANO Pó, entre os quais não foram encontradas diferenças. Aos 10 e 12 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Em relação ao tempo, nota-se diminuição da atividade de ALP das células dos grupos NANO Controle, NANO Laser e NANO Imp aos 12 dias em relação aos 10 e 7 dias, entre os quais não houve diferença estatisticamente significativa. No grupo NANO Pó, a atividade de ALP aumentou de 7 para 10 dias, e diminuiu aos 12 dias. (Figura 5.6)

Figura 5.6 - Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (NANO), NANO modificadas por laser (NANO Laser), NANO modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e NANO modificadas por pó abrasivo (NANO Pó), por 7, 10 e 12 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos dentro de um mesmo tempo experimental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo em relação ao tempo experimental (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) ( $n=04$ ).

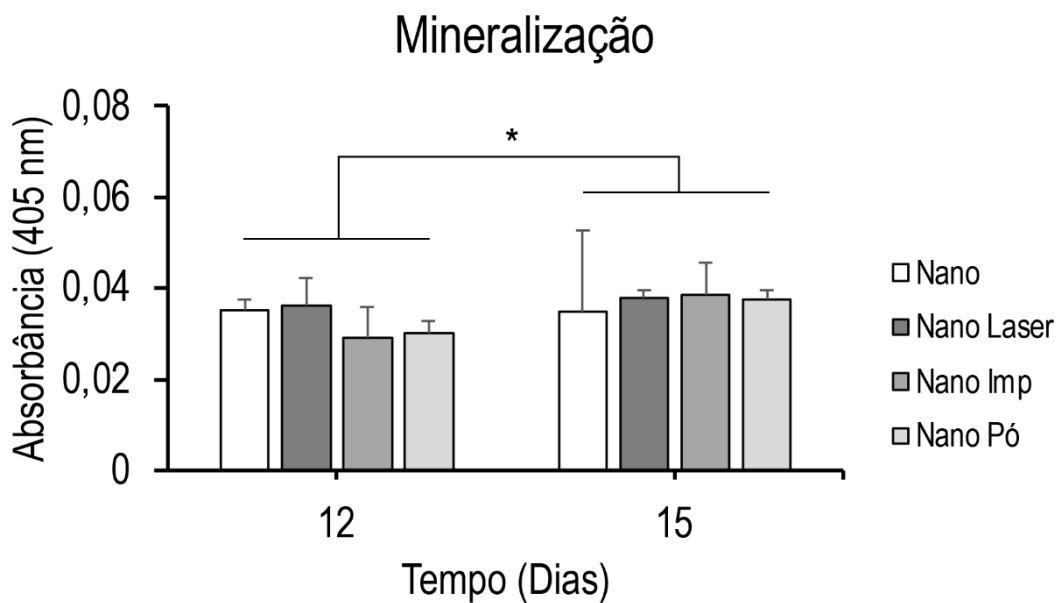


Fonte: A autora.



A produção de matriz extracelular mineralizada não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA 2 fatores,  $p= 0,444$ ) ou na interação grupo-tempo ( $p= 0,071$ ). Contudo, nota-se diferença em relação ao tempo, independente do grupo experimental, com aumento da mineralização de 12 para 15 dias (ANOVA 2 fatores,  $p <0,001$ ) (Figura 5.7).

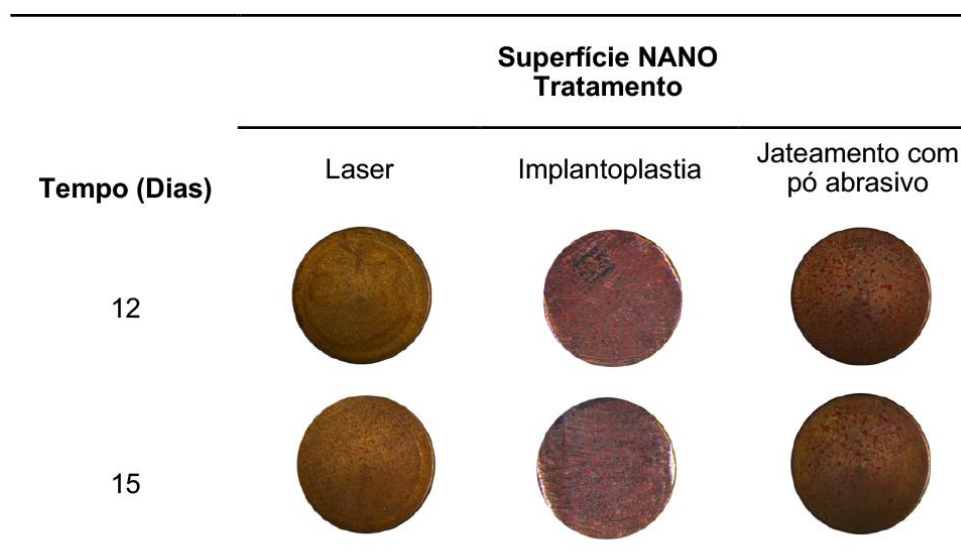
Figura 5.7 - Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (NANO), NANO modificadas por laser (NANO Laser), NANO modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e NANO modificadas por pó abrasivo (NANO Pó), por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Asterisco (\*) indica diferença entre os tempos, independentes dos grupos experimentais. (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) ( $n=04$ ).



Fonte: A autora.

Ao final de 12 e 15 dias, nódulos de matriz mineralizada foram evidenciados pelo corante vermelho de Alizarina (figura 5.8)

Figura 5.8 - Nódulos de matriz extracelular mineralizada produzidos por células SAOS-2, cultivadas sobre superfícies de discos de titânio modificados por nanotopografia (NANO) e tratados com Laser (NANO Laser), Implantoplastia (NANO Imp) e Pó (NANO Pó), aos 12 e 15 dias



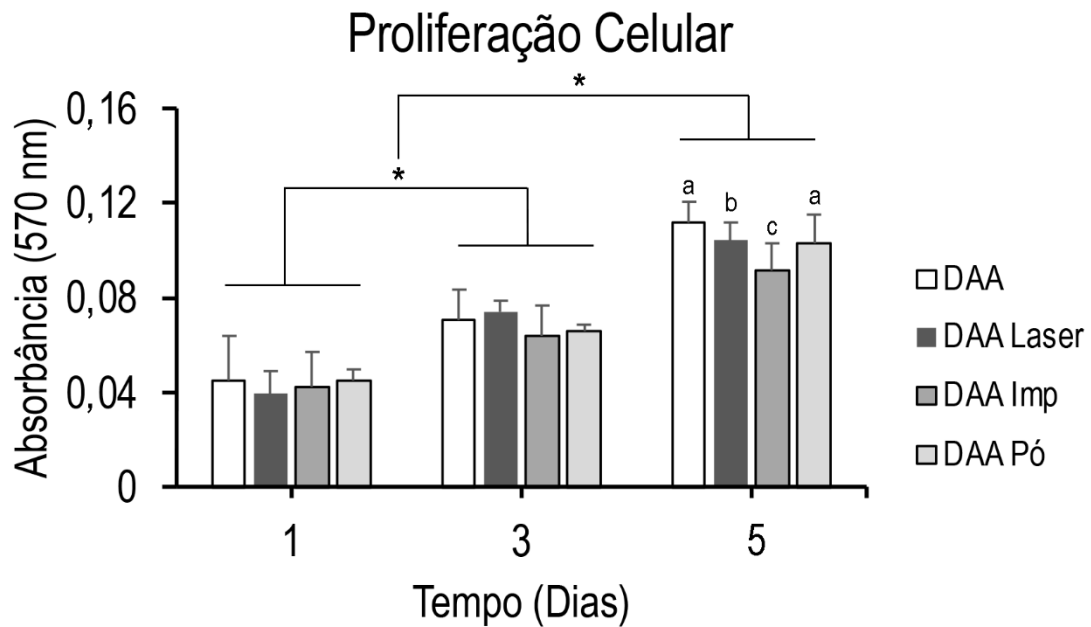
Fonte: A autora.

### 5.2.3 Efeito dos tratamentos sobre a superfície de Ti DAA

A proliferação celular apresentou diferenças estatisticamente significativa entre os grupos, tempo e na interação grupo-tempo (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,001$ , para todas as dependências avaliadas). Aos 1 e 3 dias não houve diferenças estatisticamente significativas de crescimento celular entre os grupos quando avaliamos cada tempo, porém observou-se que há crescimento celular entre os tempos. Assim, 1, 3 e 5 dias são diferentes entre si, sendo 5 dias maior que 1 e 3 dias. Aos 5 dias, nota-se que há diferença de crescimento celular entre os grupos. As superfícies DAA e DAA Pó apresentaram o mesmo crescimento (ANOVA 2 fatores,  $p = 0,451$ ), sendo superior aos

demais grupos. A superfície DAA Imp apresentou o menor crescimento celular quando comparado aos demais grupos. (Figura 5.9)

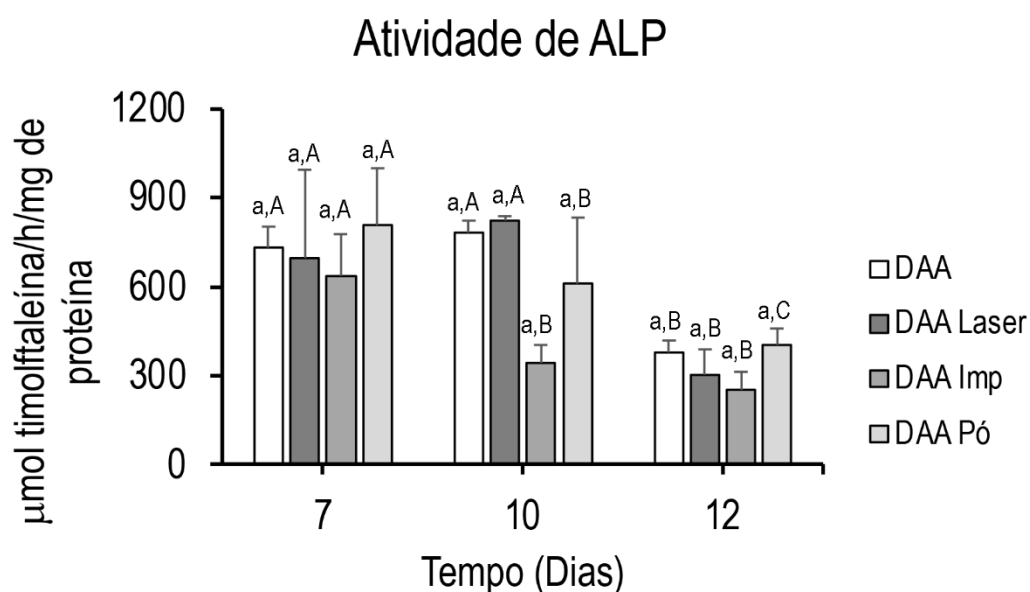
Figura 5.9 - Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana Saos-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com duplo ataque ácido (DAA), duplo ataque ácido modificada por laser (DAA Laser), duplo ataque ácido modificada por implantoplastia (DAA Imp) e duplo ataque ácido modificada por pó abrasivo (DAA Pó) por 1, 3 e 5 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos (\*) representam as diferenças estatisticamente significantes entre os tempos experimentais independentes dos grupos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos dentro de um mesmo tempo experimental. (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04)



Fonte: A autora.

A atividade de ALP apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e entre os tempos (ANOVA 2 fatores,  $p= 0,002$  e  $p <0,001$ , respectivamente). Aos 7 dias, não houve diferença estatisticamente significativa na atividade de ALP entre os grupos (ANOVA 2 fatores,  $p= 0,052$ ). Houve aumento da atividade de ALP de 7 para 10 dias para os grupos DAA e DAA Laser e redução da atividade de ALP nos grupos DAA Imp e DAA pó. Aos 12 dias, a atividade de ALP foi menor em todos os grupos. (Figura 5.10)

Figura 5.10 - Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com duplo ataque ácido (DAA), duplo ataque ácido modificada por laser (DAA Laser), duplo ataque ácido modificada por implantoplastia (DAA Imp) e duplo ataque ácido modificada por pó abrasivo (DAA Pó), por 7, 10 e 12 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos dentro de um mesmo tempo experimental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo em relação ao tempo experimental (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).

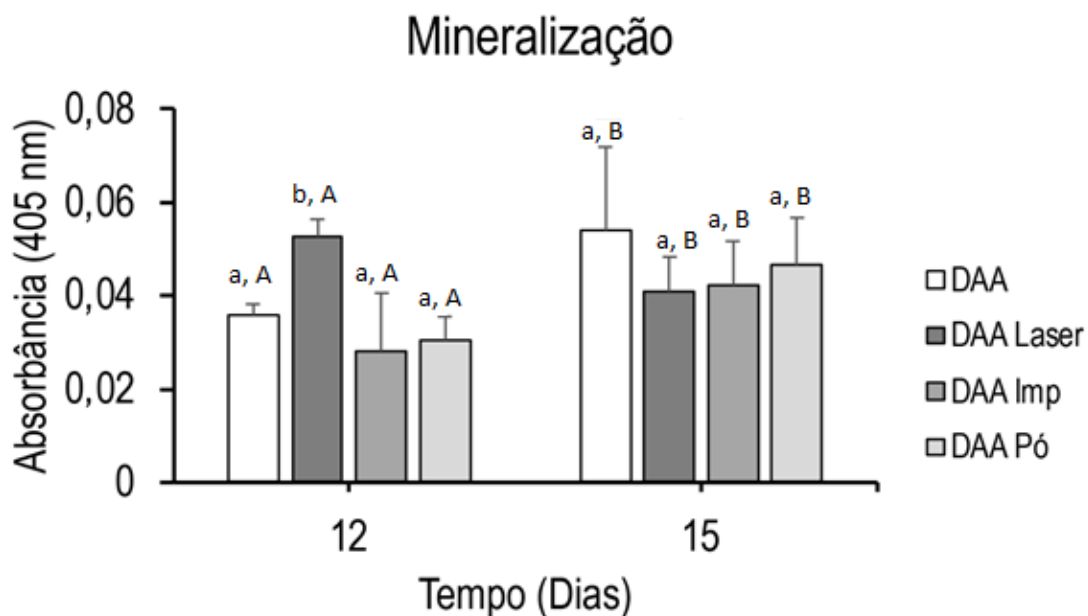


Fonte: A autora.

A produção de matriz extracelular mineralizada apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, tempo e na interação tempo-grupo (ANOVA 2 fatores,  $p= 0,042$ ,  $p= 0,002$  e  $p= 0,001$ , respectivamente). Aos 12 dias, nota-se que a superfície DAA Laser apresentou resultados superiores aos demais grupos (DAA, DAA Imp e DAA Pó) e estes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. Contudo, aos 15 dias, não há diferenças estatísticas significantes entre todos os grupo.

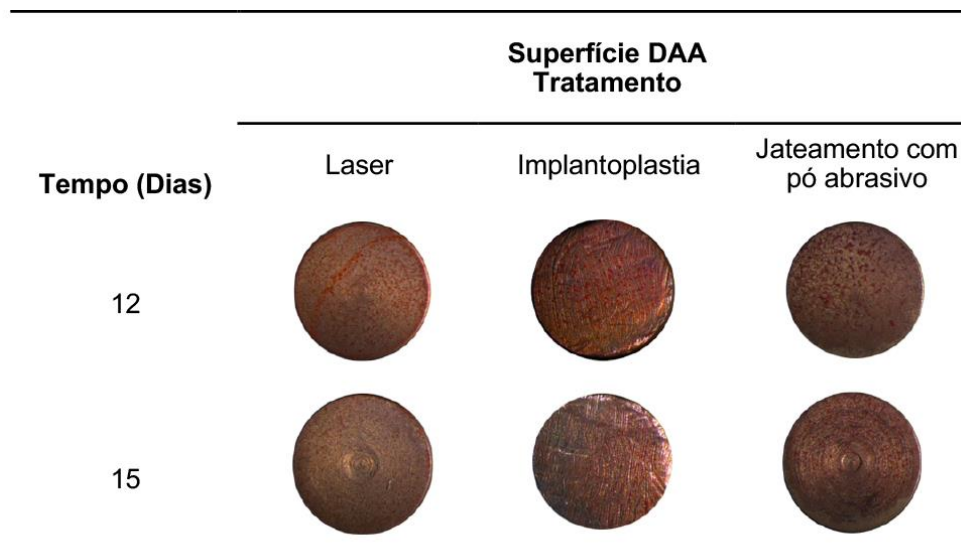
Em relação ao tempo experimental, houve diferença estatisticamente significativa nos grupos, apontando maior deposição de matriz extracelular mineralizada dos 12 para os 15 dias de experimento, exceto o DAA Laser na qual nota-se redução. (Figura 5.11)

Figura 5.11 - Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com duplo ataque ácido (DAA), duplo ataque ácido modificadas por laser (DAA Laser), duplo ataque ácido modificadas por implantoplastia (DAA Imp) e duplo ataque ácido modificadas por pó abrasivo (DAA Pó), por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos dentro de um mesmo tempo experimental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo em relação ao tempo experimental (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) ( $n=04$ )



Ao final de 12 e 15 dias, nódulos de matriz mineralizada foram evidenciados pelo corante vermelho de Alizarina (figura 5.2.3.4)

Figura 5.12 – Nódulos de matriz extracelular mineralizada produzidos por células SAOS-2, cultivadas sobre superfícies de discos de titânio modificados por duplo ataque ácido (DAA) e tratados com Laser (DAA Laser), Implantoplastia (DAA Imp) e Pó (DAA Pó), aos 12 e 15 dias



Fonte: A autora.

Um questionamento que surgiu foi se os tratamentos poderiam resultar em diferentes respostas celulares na dependência do tipo de superfície de Ti. Para verificar tal parâmetro realizamos a análise de cada modalidade de tratamento para peri-implantite independente da superfície utilizada

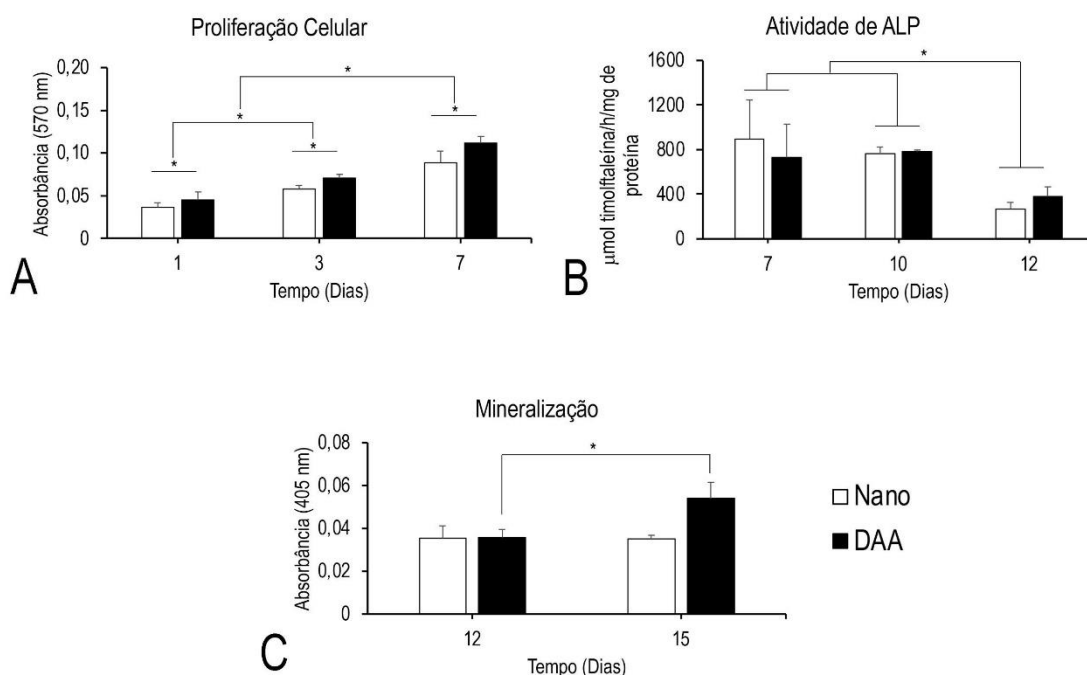
#### 5.2.4 Superfícies NANO x DAA sem tratamento

A proliferação celular foi diferente em relação aos grupos e tempos experimentais (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,001$  para ambos), mas não houve diferença estatisticamente significativa na interação grupo-tempo ( $p = 0,137$ ). A proliferação foi maior nas células crescidas em DAA em relação ao NANO em todos os tempos experimentais. Em relação ao tempo, nota-se aumento de 1 para 5 dias em todos os grupos avaliados (Figura 5.13 A).

A atividade de ALP não apresentou diferenças significativas entre os grupos ou na interação grupo-tempo, mas foi diferente em relação ao tempo (ANOVA 2 fatores,  $p = 0,897$ ,  $p = 0,314$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). Com relação ao tempo experimental, a atividade de ALP foi menor aos 12 em relação aos 7 e 10 dias, dentre os quais não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 5.13 B).

A produção de matriz extracelular mineralizada apresentou diferença estatisticamente significativa apenas na interação grupo-tempo (ANOVA 2 fatores,  $p = 0,333$  para grupos,  $p = 0,535$  para tempo,  $p = 0,013$  para interação). A quantidade de matriz produzida pelas células no grupo DAA é maior que a de NANO aos 15 dias, enquanto aos 12 dias não houve diferença. Ainda, nota-se aumento da mineralização nas células do grupo DAA de 12 para 15 dias, enquanto no grupo NANO não houve diferença em relação ao tempo (Figura 5.13 C).

Figura 5.13 - (A) Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (NANO) e com duplo ataque ácido (DAA) por 1, 3 e 5 dias. (B) Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies NANO e DAA por 7, 10 e 12 dias. (C) Quantificação de matriz extracelular mineralizada produzidas por SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies NANO e DAA por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) ( $n=04$ )



Fonte: A autora.

### 5.2.5 Superfícies NANO Laser x DAA Laser

A proliferação das células crescidas sobre as superfícies NANO Laser e DAA Laser não apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos e na interação grupo-tempo, mas foi diferente em relação ao tempo (ANOVA 2 fatores,  $p= 0,129$ ,  $p= 0,113$  e  $p<0,001$ , respectivamente). Quanto ao tempo, houve aumento da proliferação de 1 para 3 e 5 dias independente do grupo avaliado (Figura 5.14 A)

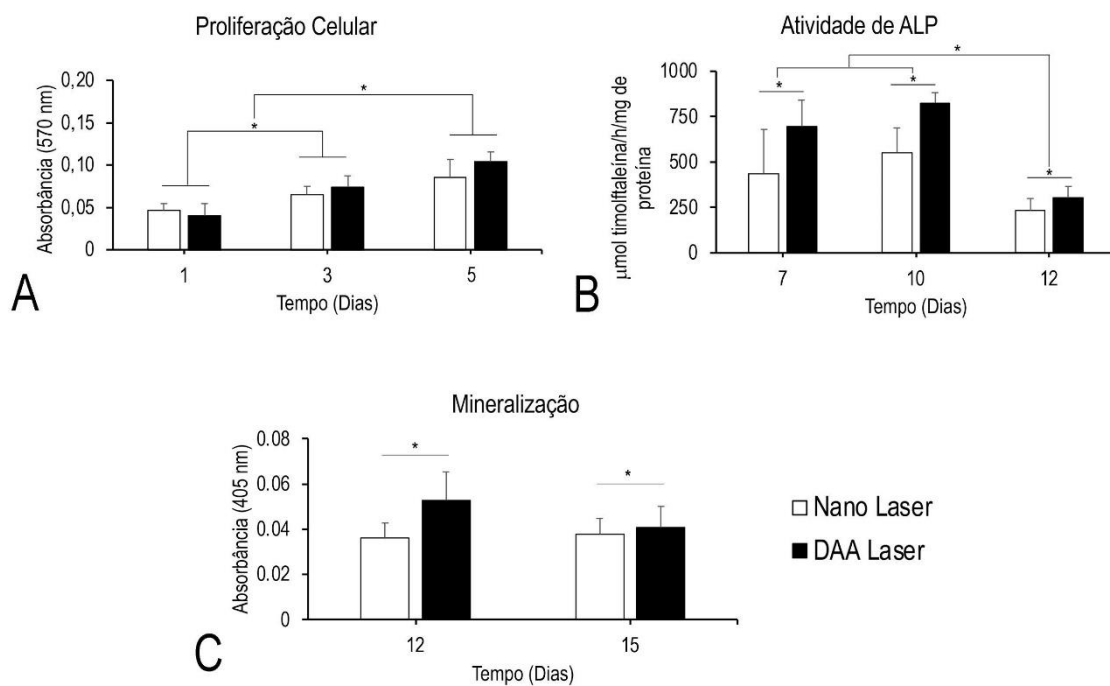
A atividade de ALP foi diferente na dependência do grupo e do tempo, mas não na interação grupo-tempo (ANOVA 2 fatores,  $p=0,002$ ,  $p < 0,001$  e  $p = 0,330$ ). Nota-se aumento da atividade de ALP nas células crescidas sobre DAA Laser em relação àquelas cultivadas em NANO Laser independente do tempo experimental. Em relação



ao tempo, a atividade de ALP é semelhante em 7 e 10 dias e diminui aos 12 dias, independente do grupo experimental (Figura 5.14 B).

A produção de matriz extracelular mineralizada apresentou diferenças estatisticamente significantes apenas na dependência do grupo experimental, enquanto não houve diferença em relação ao tempo e na interação grupo-tempo (ANOVA 2 fatores,  $p = 0,027$ ,  $p = 0,316$  e  $p = 0,088$ ). Em relação aos grupos, a mineralização foi maior nas células crescidas sobre a superfície DAA Laser comparado à NANO Laser (Figura 5.14 C).

Figura 5.14 - (A) Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por laser (NANO Laser) e com duplo ataque ácido modificadas por laser (DAA laser) por 1, 3 e 5 dias. (B) Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por laser (NANO Laser) e com duplo ataque ácido modificadas por laser (DAA Laser) por 7, 10 e 12 dias. (C) Quantificação de matriz extracelular mineralizada produzidas por SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por laser (NANO Laser) e com duplo ataque ácido modificadas por laser (DAA Laser) por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos dentro de um mesmo tempo experimental. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04).



Fonte: A autora.

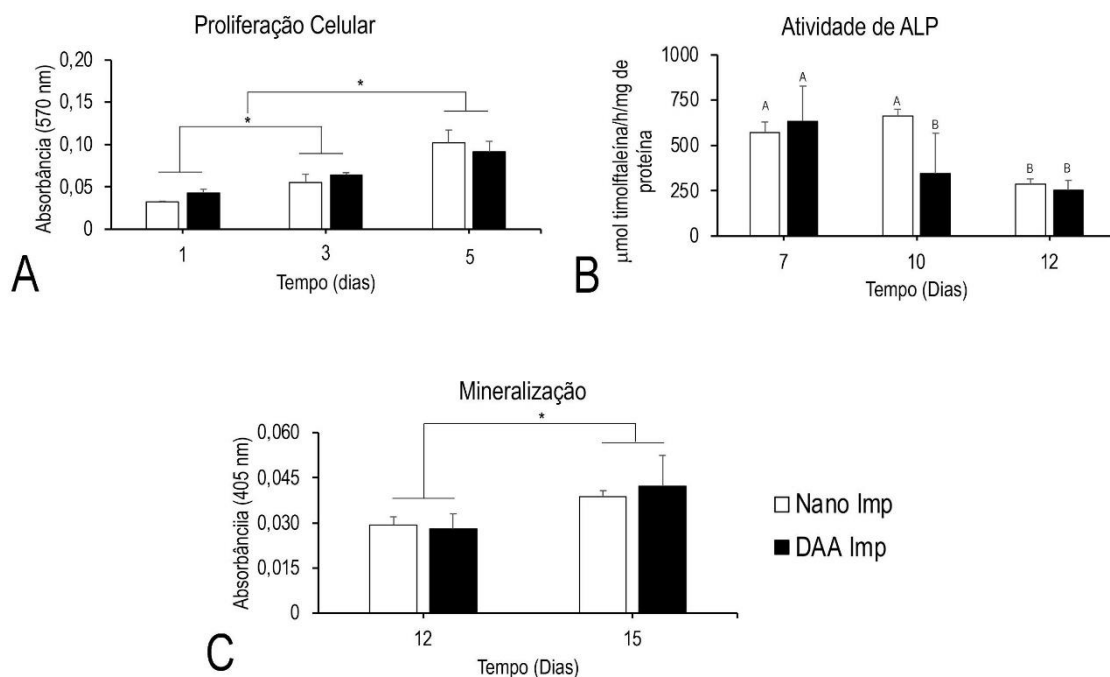
### 5.2.6 Superfícies NANO Imp x DAA Imp

A proliferação não apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo, mas foi diferente em relação ao tempo e na interação grupo-tempo (ANOVA 2 fatores,  $p = 0,314$ ,  $p < 0,001$  e  $p = 0,022$ , respectivamente). Houve aumento da proliferação de 1 para 3 e 5 dias independente do grupo avaliado, sem diferenças entre os grupos em cada tempo experimental (Figura 5.15 A).

A atividade de ALP foi diferente na dependência do grupo, tempo e da interação grupo-tempo (ANOVA 2 fatores,  $p = 0,036$ ,  $p < 0,001$  e  $p = 0,004$ ). A atividade de ALP nas células crescidas sobre NANO Imp foi igual de 7 para 10 dias e diminuiu aos 12 dias, enquanto as células do grupo DAA Imp apresentaram maior atividade de ALP aos 7 dias com diminuição aos 10 e 12 dias, sem diferenças entre os últimos períodos. Em relação aos grupos, a atividade de ALP em NANO Imp foi maior DAA Imp apenas aos 10 dias. (Figura 5.15 B).

A produção de matriz extracelular mineralizada não apresentou diferenças estatisticamente significante em relação ao grupo e na interação grupo-tempo, mas foi diferente em relação ao tempo experimental (ANOVA 2 fatores,  $p = 0,364$ ,  $p = 0,586$  e  $p < 0,001$ ). Assim, nota-se maior deposição de matriz mineralizada aos 15 dias em comparação aos 12 dias independente do grupo experimental (Figura 5.15 C).

Figura 5.15 - (A) Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e com duplo ataque ácido modificadas por implantoplastia (DAA Imp) por 1, 3 e 5 dias. (B) Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e com duplo ataque ácido modificadas por implantoplastia (DAA Imp) por 7, 10 e 12 dias. (C) Quantificação de matriz extracelular mineralizada produzidas por SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por implantoplastia (NANO Imp) e com duplo ataque ácido modificadas por implantoplastia (DAA Imp) por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo em relação ao tempo experimental. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04)



Fonte: A autora.

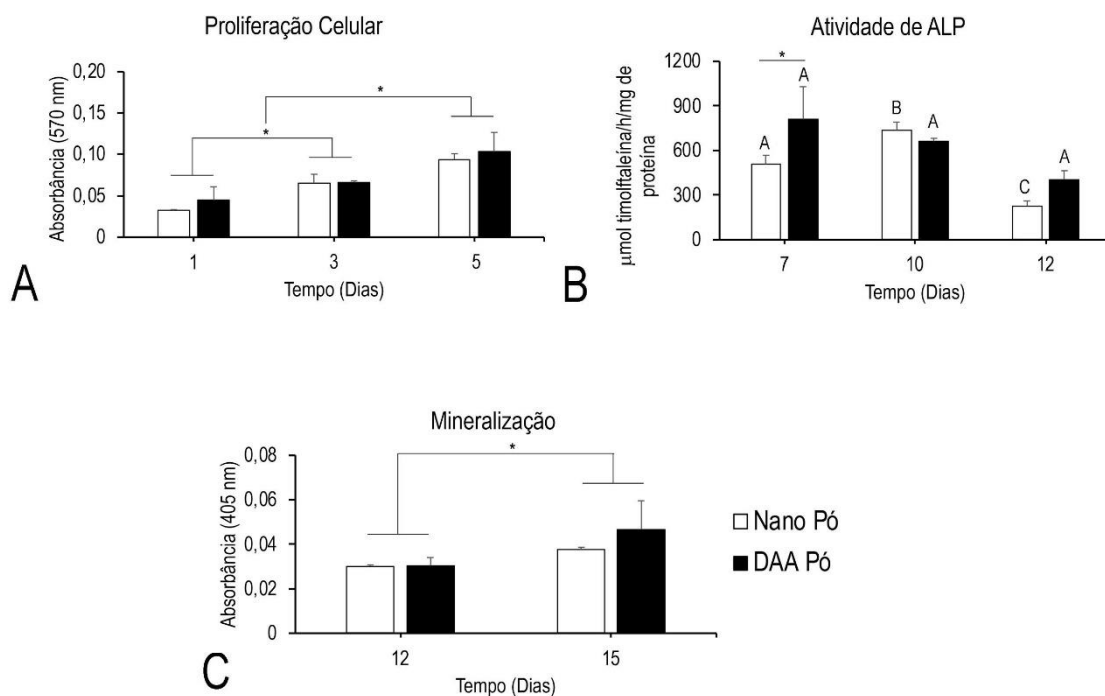
### 5.2.7 Superfícies NANO Pó x DAA Pó

A proliferação celular não apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos e na interação grupo-tempo, mas foi diferente em relação ao tempo (ANOVA 2 fatores,  $p = 0,085$ ,  $p = 0,525$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). Houve aumento da proliferação de 1 para 3 e 5 dias independente do grupo (Figura 5.16 A).

A atividade de ALP apresentou diferenças estatisticamente significantes na comparação entre grupo, tempos experimentais e na interação grupo-tempo (ANOVA 2 fatores,  $p = 0,015$ ,  $p < 0,001$  e  $p = 0,019$ , respectivamente). As células do grupo DAA Pó apresentaram maior atividade de ALP comparado à NANO Pó apenas aos 7 dias, sem diferenças nos outros períodos avaliados. Quanto ao tempo experimental, houve aumento da atividade de ALP nas células do grupo nano pó de 7 para 10 dias, com diminuição aos 12 dias. Nas células do grupo DAA pó, a atividade de ALP foi igual em 7 e 10 dias e diminuiu aos 12 dias (Figura 5.16 B).

A produção de matriz extracelular mineralizada não apresentou diferenças estatisticamente significante em relação ao grupo e na interação grupo-tempo, mas foi diferente em relação ao tempo experimental (ANOVA 2 fatores,  $p = 0,065$ ,  $p = 0,234$  e  $p = 0,001$ ). Independente do grupo, nota-se aumento da deposição de matriz mineralizada de 12 para 15 dias (Figura 16 C).

Figura 5.16 - (A) Proliferação de células da linhagem osteoblástica humana SAOS-2 cultivadas sobre superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por pó abrasivo (NANO Pó) e com duplo ataque ácido modificadas por pó abrasivo (DAA Pó) por 1, 3 e 5 dias. (B) Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por pó abrasivo (NANO Pó) e com duplo ataque ácido modificadas por pó abrasivo (DAA Pó) por 7, 10 e 12 dias. (C) Quantificação de matriz extracelular mineralizada produzidas por SAOS-2 cultivadas sobre as superfícies de titânio com nanotopografia modificadas por pó abrasivo (NANO Pó) e com duplo ataque ácido modificadas por pó (DAA Pó) por 12 e 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo em relação ao tempo experimental. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA 2 fatores,  $p < 0,05$ ) (n=04)



Fonte: A autora.



## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar, por meio do cultivo celular, o efeito de três procedimentos clínicos realizados para solucionar a peri-implantite (plastia por brocas, por pó abrasivo e por laser) em dois tipos de superfícies de titânio (tratamento de superfície de duplo ataque ácido e de nanotopografia) avaliando as características morfológicas resultantes de tais tratamentos nas superfícies estudadas e se essas modificações iriam resultar em alterações na biocompatibilidade e proliferação celular. Nossos resultados demonstraram que, mesmo modificando a superfície de titânio, removendo total ou parcialmente os tratamentos de superfícies empregados pelo fabricante, todas as modalidades de tratamento para peri-implantite empregadas permitiram a adesão e proliferação celular sugerindo, assim, que podem ser meios empregados para o tratamento de peri-implantite com posterior reosseointegração. Toma e colaboradores (2016) também obtiveram resultados semelhantes em seus experimentos, no qual utilizaram discos de titânio com superfícies jateadas por esferas de óxido de alumínio e estes foram submetidos a tratamentos para peri-implantite com curetas de plástico, escovas de titânio e implantoplastia. Eles demonstraram que mesmo que as superfícies sofressem alterações todas elas foram capazes de promover a adesão e proliferação celular e ainda apresentar um fenótipo de osteoblasto maduro (17).

A utilização do MEV nos permitiu avaliar a topografia dos discos tratados e com isso verificar os danos causados na superfície de titânio. Os discos utilizados apresentavam uma superfície com microescala – DAA ou uma superfície com nanoescala – Nano. Pudemos observar, no grupo controle, discos com uma superfície com rugosidade e porosidade uniformes em ambos os tratamentos. Ao aumento de 500 nm pode-se observar que o tratamento Nano apresenta adicionalmente partículas fusiformes por toda a superfície. Foi observado que a superfície DAA Pó conseguiu preservar melhor a superfície original do disco dentre os grupos estudados. Nossos achados vão de encontro aos resultados obtidos por Lollobrigida e colaboradores (2020), em que os discos tratados por pó de abrasivo não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. As alterações na morfologia da superfície foram apreciáveis, consistindo em leve arredondamento das arestas. Ao aumentar a magnificação, resíduos de pó de glicina foram detectados, assim como em nossas

imagens (86). A existência de estruturas residuais também foi observada em outros estudos (87, 88) e parece ser uma consequência inevitável do uso de abrasivos.

Quanto ao uso do laser de diodo, os resultados deste estudo estão de acordo com a literatura, visto que outros autores também não relataram alterações significativas em amostras de titânio irradiadas com este tipo de laser (86, 89). Stübinger e colaboradores (2010) utilizaram laser de diodo, em modo contínuo, com potências variando entre 1W e 3W (90). El Chaar e colaboradores (2020) analisaram, por meio de MEV, a superfície de implantes contaminados e a implantoplastia foi o tratamento que conseguiu apresentar maior remoção do biofilme. Já o uso de pó abrasivo e laser de Er:YAG laser conseguiu remover parcialmente os detritos. Isso pode influenciar na posterior atividade celular durante a re-osseointegração visto que a contaminação não foi removida integralmente (66). Em nosso trabalho utilizamos discos esterilizados e por isso conseguimos observar que os tratamentos em si são capazes de promover a proliferação celular. É importante ressaltar que por estarmos utilizando discos de titânio ao invés de implantes os tratamentos para peri-implantite empregados apresentam eficiência maior, pois as áreas expostas são tratadas com maior facilidade. Quando pensamos no emprego de tais técnicas em pacientes devemos levar em conta o acesso limitado e que isso irá dificultar a limpeza por completo da superfície implantar.

As células ósseas são sensíveis à morfologia do material sobre o qual são semeadas e isso pode resultar em diferenças fenotípicas, alteração na adesão e proliferação (91). A literatura demonstra que superfícies de Ti com microtopografia conseguem modular a resposta das células osteoblásticas e com isso aumentam osteogênese e adesão celular. Outros estudos destacam que a nanotopografia promove a regulação da atividade dos osteoblastos e por isso afetam a resposta da osseointegração (92). induzindo a diferenciação osteogênica, secreção e mineralização da matriz (93, 94). A Saos-2 cresceu em todos os grupos estudados, não apresentando diferença fenotípica nas primeiras 24h, a morfologia apresentada pelas células era espalhada com extensões citoplasmáticas e filopódios para aderir melhor à superfície e se espalhar sobre ela. Após 72h as células Saos-2 apresentaram proliferação e adesão nos discos de titânio de forma regular, em todos os grupos, se espalhando pela superfície dos discos e apresentando forma poligonal, espalhada e alongada com tamanhos ampliados nos grupos com tratamentos para peri-implantite. Enquanto nos grupos controle, tanto na superfície Nano quanto na superfície DAA, as



células possuem tamanhos mais reduzidos com formas mais arredondadas. Nossos achados vão de encontro com Shapira e Halabi (2009) e Toma e colaboradores (2016) que avaliaram o crescimento e a adesão de Saos-2 sobre superfície polida e rugosa de discos de titânio e descreveram a morfologia da Saos-2 como espreada com muitos processos celulares e vesículas extracelulares além disso demonstraram que células cultivadas em superfícies ásperas tendem a exibir atributos de osteoblastos mais diferenciados do que células cultivadas em superfícies lisas (17, 95).

A adesão celular, pôde ser observada, empiricamente, durante a análise das imagens dos discos de MEV não apresentando diferença entre os grupos. Shapira e colaboradores (2009) descreveram que células cultivadas em superfícies mais rugosas exibiam morfologia mais espreada com prolongamentos mais irregulares enquanto células cultivadas em superfícies lisas apresentavam menores prolongamentos e formas mais regulares com poucos extensões celulares (95) o que vai de encontro com nossos achados.

A apresentação dos resultados foi realizada de duas maneiras: comparando os dados obtidos dentro do mesmo tipo de superfície, ou seja, a análise dos tratamentos para peri-implantite para a superfície DAA e outra análise para a superfície Nano e pela comparação apenas levando em conta o tipo de tratamento, para que fosse avaliado se os tratamentos poderiam resultar em diferentes respostas celulares na dependência do tipo de superfície de Ti.

Quando comparamos os discos de superfície NANO identificamos que não houve diferença na proliferação celular e nem na formação de matriz óssea mineralizada para todos os tratamentos empregados em relação ao grupo controle e apenas o tratamento com pó abrasivo apresentou aumento de ALP de 7 para 10 dias. Já a superfície DAA apresentou maior proliferação celular aos 5 dias para os grupos DAA e DAA pó, isso pôde ter acontecido devido ao tratamento com pó abrasivo ainda manter boa parte das características topográficas iniciais dos discos. Na análise de ALP e mineralização a superfície DAA laser obteve melhores resultados o que pode nos sugerir que ao optarmos pelo uso da laserterapia para remoção do biofilme a superfície com duplo ataque ácido é a que possui melhor resposta. Nossos achados vão de encontro aos de Kadkhodazadeh e colaboradores (2022) no qual utilizaram discos de titânio com superfícies tratadas com ataque ácido e compararam o tratamento com laser versus o uso de pó abrasivo. Os autores observaram que as células tronco derivadas de polpa dental humana possuíram maior diferenciação e

viabilidade nos discos que foram submetidos ao tratamento com o laser e que esse seria mais eficaz na descontaminação das superfícies de Ti afetadas. Além disso, a expressão dos marcadores da atividade da ALP e osteocalcina foram maiores nos discos descontaminados com Er:YAG (96).

Os grupos que receberam a modificação da sua superfície por plastia por brocas apresentaram a remoção completa do tratamento de superfície empregado pela empresa, expondo assim, o titânio tipo IV e resultando em uma superfície com delaminações não podendo ser considerada completamente lisa. Contudo, tal modificação, mesmo que alterando por completo a superfície inicial do disco, ainda foi capaz de permitir que ocorresse a proliferação celular assim como percebemos a atividade da fosfatase alcalina e produção da matriz óssea mineralizada. Os tratamentos por pó abrasivo ou laser mantiveram em alguns pontos sua superfície original, porém pudemos observar que o tratamento que manteve a melhor integridade da superfície do fabricante foi o tratamento com pó abrasivo na superfície de DAA. Assim, ao compararmos as modalidades de tratamentos para peri-implantite empregadas, nossos achados sugerem que a superfície DAA apresenta discreta resposta superior em relação à superfície NANO. A superfície DAA, quando comparadas à superfície NANO apresentou maior proliferação e mineralização aos 15 dias. O mesmo ocorreu quando empregamos o tratamento com laser, a superfície DAA apresentou melhores resultados na ALP e mineralização. O tratamento com pó abrasivo apresentou melhores resultados com a superfície DAA apenas para ALP.

É importante ressaltar o fato de que os tratamentos foram realizados em discos novos e limpos de forma simplificada e em condições altamente padronizadas em laboratório, o que é significativamente diferente de uma situação clínica, na qual temos a geometria do implante, o osso peri-implantar, sangue, células inflamatórias, proteínas e o biofilme. Assim, é necessário cautela ao extrapolar os presentes achados para a prática clínica e mesmo que não tenhamos verificado diferenças significativas, todos os parâmetros estudados tenderam a ser mais relevantes nas células cultivadas sobre as superfícies de duplo ataque ácido. Os achados, entretanto, não representam obrigatoriamente um melhor processo de osseointegração. Com isso, faz-se necessário estudos *in vivo* utilizando tais tratamentos.

A escolha do laser de diodo se deu, pois, diversos estudos demonstraram sua eficácia na descontaminação das superfícies dos implantes sem efeitos adversos aos tecidos adjacentes. Entretanto, apesar desses relatos na literatura sobre o seu uso clínico na implantodontia, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais os lasers exercem seus efeitos nas superfícies dos implantes. Além disso, considerando que as superfícies de tratamentos dos implantes variam entre seus fabricantes e muitas vezes não temos acesso à todas as etapas de sua produção devido ao sigilo mantido pelas empresas, não há consenso em um tratamento padrão auxiliado por laser para peri-implantite (32).

A literatura oferece evidências de que o laser de diodo  $\lambda$  808 nm pode executar uma redução eficiente do biofilme de *S. aureus* e desintoxicação lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina bacteriana na superfície de titânio testada. Realizando uma irradiação de 1 minuto dos discos de titânio revestidos com biofilme, o laser foi capaz de reduzir 99% do número de unidades formadoras de colônia no modo de onda contínua. Além disso, a análise de MEV dos discos revelou que, o laser de diodo não alterou as características originais da camada superficial de óxido de titânio, caracterizada por micro rugosidade e microporos (32).

O uso de pó abrasivo foi relatado, por John e colaboradores (2016), ser superior ao uso de curetas na remoção do biofilme. Além disso, em sua análise de MEV, mostrou apenas pequenas alterações na superfície dos discos de titânio como um discreto achatamento das arestas das elevações produzidas pelo ataque ácido na topografia o que vai de encontro com nossos achados, pois evidenciamos, por meio da MEV, que o tratamento com o pó abrasivo na superfície DAA foi o que menos resultou em alterações (64). Em relação à proliferação celular, tais autores relatam haver uma menor biocompatibilidade e, conseqüentemente, menor crescimento celular. Entretanto, ressaltam que presença de biofilme pode levar a alterações na camada de óxido de titânio e isso poderia alterar a energia de superfície e reduzir as condições para a adesão celular (97). Experimentos *in vitro*, no qual não foram realizadas contaminações prévias, demonstram haver boa adesão e proliferação celular após a realização da aplicação do pó abrasivo sob a superfície de titânio, como os achados apresentados por esse estudo (17, 98).

A plastia por brocas é um tratamento que promove alterações na superfície topográfica do implante sem alterar sua resistência a fratura, quando realizado com um protocolo cauteloso, segundo Costa-Berenguer e colaboradores (2017) (99). Além disso, Toma e colaboradores (2018), relataram que implantoplastia foi mais eficaz que a cureta plástica para a remoção do biofilme da espécie *S. gordonii* e na prevenção de sua recolonização em superfícies de discos de titânio (100). Entretanto, para alguns autores, a implantoplastia é um tratamento que pode liberar partículas do tamanho de nanômetros, cujos efeitos sistêmicos ainda não são totalmente compreendidos e assim tais autores não recomendam a implantoplastia para o tratamento da peri-implantite (101). Uma possível limitação do presente estudo está relacionada ao fato que a implantoplastia foi realizada manualmente. Isso leva a falta de controle sobre variáveis importantes como pressão e número de vezes que as brocas foram aplicadas na superfície dos discos de titânio. Entretanto, a realização desse procedimento nos discos de Ti sem uma padronização é mais semelhante a um cenário clínico real.

Assim faz-se necessário realizar estudos sobre os efeitos dos tratamentos para peri-implantite em micro e nanoestruturas de titânio visando avaliar se tais superfícies influenciam estágios posteriores da osteogênese e como se dará a reparação óssea *in vivo*. Além disso estudos clínicos padronizados e randomizados com protocolos bem definidos irão proporcionar auxílio aos clínicos frente ao tratamento de tal doença.

## **7 CONCLUSÃO**

Nos limites metodológicos deste estudo, podemos concluir que os procedimentos para o tratamento da peri-implantite que modificam a superfície de implantes conseguem promover a viabilidade e proliferação e o potencial de diferenciação celular. Além disso, a superfície com duplo ataque ácido tratada por laser comporta-se de forma favorável promovendo maior atividade de ALP e produção de matriz mineralizada quando comparada às demais superfícies.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

1. Kormas I, Pedercini C, Pedercini A, Raptopoulos M, Alassy H, Wolff LF. Peri-Implant Diseases: Diagnosis, Clinical, Histological, Microbiological Characteristics and Treatment Strategies. A Narrative Review. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Nov 22;9(11):835. doi: 10.3390/antibiotics9110835.
2. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S286-S291. doi: 10.1111/jcpe.12957.
3. Novaes AB, de Souza SL, de Barros RR, Pereira KK, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J*. 2010;21(6):471-81. doi: 10.1590/s0103-64402010000600001.
4. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007 Jul;23(7):844-54. doi: 10.1016/j.dental.2006.06.025.
5. Zhao G, Raines AL, Wieland M, Schwartz Z, Boyan BD. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials*. 2007 Jun;28(18):2821-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.024.
6. Brett PM, Harle J, Salih V, Mihoc R, Olsen I, Jones FH, et al. Roughness response genes in osteoblasts. *Bone*. 2004 Jul;35(1):124-33. doi: 10.1016/j.bone.2004.03.009.
7. Anselme K, Bigerelle M. Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short-term adhesion. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 May;17(5):471-9. doi: 10.1007/s10856-006-8475-8.
8. Anselme K, Bigerelle M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomater*. 2005 Mar;1(2):211-22. doi: 10.1016/j.actbio.2004.11.009

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

9. López-Valverde N, Flores-Fraile J, Ramírez JM, Sousa BM, Herrero-Hernández S, López-Valverde A. Bioactive Surfaces vs. Conventional Surfaces in Titanium Dental Implants: A Comparative Systematic Review. *J Clin Med*. 2020 Jun 29;9(7):2047. doi: 10.3390/jcm9072047
10. Renvert S, Polyzois I, Maguire R. Re-osseointegration on previously contaminated surfaces: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20 Suppl 4:216-27.
11. Renvert S, Roos-Jansåker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8 Suppl):305-15.
12. Heitz-Mayfield LJA, Mombelli A. The Therapy of Peri-implantitis: A Systematic Review. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2014;29:325-45.
13. Suarez-Lopez Del Amo F, Yu SH, Wang HL. Non-Surgical Therapy for Peri-Implant Diseases: a Systematic Review. *J Oral Maxillofac Res*. 2016 Sep 9;7(3):e13. doi: 10.5037/jomr.2016.7313
14. Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: treatment of peri-implantitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jan 18;1(1):CD004970. doi: 10.1002/14651858.CD004970.pub5
15. Lindhe J, Meyle J, Periodontology GDoEWo. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8 Suppl):282-5.
16. Subramani K, Wismeijer D. Decontamination of titanium implant surface and re-osseointegration to treat peri-implantitis: a literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012;27(5):1043-54.
17. Toma S, Lasserre J, Brex MC, Nyssen-Behets C. In vitro evaluation of peri-implantitis treatment modalities on Saos-2osteoblasts. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(9):1085-92.
18. Montes CC, Pereira FA, Thomé G, Alves ED, Acedo RV, de Souza JR, et al. Failing factors associated with osseointegrated dental implant loss. *Implant Dent*. 2007;16(4):404-12.



19. Insua A, Monje A, Wang HL, Inglehart M. Patient-Centered Perspectives and Understanding of Peri-implantitis. *J Periodontol.* 2017;1-15.
20. Al-Sabbagh M, Shaddox LM. Is Peri-Implantitis Curable? *Dent Clin North Am.* 2019;63(3):547-66.
21. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S267-S90.
22. Hussain RA, Miloro M, Cohen JB. An Update on the Treatment of Periimplantitis. *Dent Clin North Am.* 2021;65(1):43-56.
23. Lang NP, Berglundh T, Periodontology WGoSEWo. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:178-81.
24. Polyzois I. Treatment Planning for Periimplant Mucositis and Periimplantitis. *Implant Dent.* 2019;28(2):150-4.
25. Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol.* 2015;42 Suppl 16:S158-71.
26. Mellado-Valero A, Buitrago-Vera P, Solá-Ruiz MF, Ferrer-García JC. Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(6):e869-76.
27. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl):286-91.
28. Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *J Periodontol.* 2010;81(2):231-8.
29. Balderrama Í, Cardoso MV, Stuani VT, Oliveira RC, Matos AA, Gregghi SLA, et al. Residual decontamination chemical agents negatively affect adhesion and proliferation of osteoblast-like cells on implant surface. *Int J Implant Dent.* 2020 Dec 17;6(1):84.doi: 10.1186/s40729-020-00278-8.

30. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11 Suppl 1:146-55.
31. Saulacic N, Schaller B. Prevalence of Peri-Implantitis in Implants with Turned and Rough Surfaces: a Systematic Review. *J Oral Maxillofac Res.* 2019 Mar 31;10(1):e1.doi: 10.5037/jomr.2019.10101
32. Giannelli M, Landini G, Materassi F, Chellini F, Antonelli A, Tani A, et al. The effects of diode laser on *Staphylococcus aureus* biofilm and *Escherichia coli* lipopolysaccharide adherent to titanium oxide surface of dental implants. An in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2016;31(8):1613-9.
33. Marrone A, Lasserre J, Bercy P, Brecx MC. Prevalence and risk factors for peri-implant disease in Belgian adults. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(8):934-40.
34. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research.* 2006;17:68-81.
35. Rokaya D, Srimaneepong V, Wisitrasameewon W, Humagain M, Thunyakitpisal P. Peri-implantitis Update: Risk Indicators, Diagnosis, and Treatment. *Eur J Dent.* 2020;14(4):672-82.
36. Tomasi C, Derks J. Clinical research of peri-implant diseases--quality of reporting, case definitions and methods to study incidence, prevalence and risk factors of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2012;39 Suppl 12:207-23.
37. Roos-Jansåker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *J Clin Periodontol.* 2006;33(4):296-301.
38. Rinke S, Ohl S, Ziebolz D, Lange K, Eickholz P. Prevalence of periimplant disease in partially edentulous patients: a practice-based cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(8):826-33.
39. Dreyer H, Grischke J, Tiede C, Eberhard J, Schweitzer A, Toikkanen SE, et al. Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: A systematic review. *J Periodontal Res.* 2018;53(5):657-81.

40. Schwarz F, Becker K, Sahm N, Horstkemper T, Rousi K, Becker J. The prevalence of peri-implant diseases for two-piece implants with an internal tube-in-tube connection: a cross-sectional analysis of 512 implants. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(1):24-8.
41. Ferreira SD, Silva GL, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol.* 2006;33(12):929-35.
42. Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl):292-304.
43. Froum SJ, Rosen PS. A proposed classification for peri-implantitis. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2012;32(5):533-40.
44. Maruyama N, Maruyama F, Takeuchi Y, Aikawa C, Izumi Y, Nakagawa I. Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis. *Sci Rep.* 2014 Oct 13;4:6602.doi: 10.1038/srep06602.
45. Strietzel FP, Reichart PA, Kale A, Kulkarni M, Wegner B, Kuchler I. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2007;34(6):523-44.
46. Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. The association between selected risk indicators and severity of peri-implantitis using mixed model analyses. *J Clin Periodontol.* 2011;38(3):285-92.
47. Renvert S, Polyzois I. Risk indicators for peri-implant mucositis: a systematic literature review. *J Clin Periodontol.* 2015;42 Suppl 16:S172-86.
48. Alshehri FA. The role of lasers in the treatment of peri-implant diseases: A review. *Saudi Dent J.* 2016;28(3):103-8.
49. Derks J, Schaller D, Håkansson J, Wennström JL, Tomasi C, Berglundh T. Effectiveness of Implant Therapy Analyzed in a Swedish Population: Prevalence of Peri-implantitis. *J Dent Res.* 2016;95(1):43-9.
50. Mombelli A, Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:203-13.

51. Madi M, Htet M, Zakaria O, Alagl A, Kasugai S. Re-osseointegration of Dental Implants After Periimplantitis Treatments: A Systematic Review. *Implant Dent.* 2018;27(1):101-10.
52. Bassetti M, Schär D, Wicki B, Eick S, Ramseier CA, Arweiler NB, et al. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: 12-month outcomes of a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(3):279-87.
53. John G, Sahm N, Becker J, Schwarz F. Nonsurgical treatment of peri-implantitis using an air-abrasive device or mechanical debridement and local application of chlorhexidine. Twelve-month follow-up of a prospective, randomized, controlled clinical study. *Clin Oral Investig.* 2015;19(8):1807-14.
54. Renvert S, Samuelsson E, Lindahl C, Persson GR. Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a double-blind randomized longitudinal clinical study. I: clinical results. *J Clin Periodontol.* 2009;36(7):604-9.
55. Arısan V, Karabuda ZC, Arıcı SV, Topçuoğlu N, Külekçi G. A randomized clinical trial of an adjunct diode laser application for the nonsurgical treatment of peri-implantitis. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(11):547-54.
56. Romeo E, Lops D, Chiapasco M, Ghisolfi M, Vogel G. Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part II: radiographic outcome. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(2):179-87.
57. Rapley JW, Swan RH, Hallmon WW, Mills MP. The surface characteristics produced by various oral hygiene instruments and materials on titanium implant abutments. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1990;5(1):47-52.
58. Wang CW, Renvert S, Wang HL. Nonsurgical Treatment of Periimplantitis. *Implant Dent.* 2019;28(2):155-60.
59. Schou S, Holmstrup P, Jørgensen T, Skovgaard LT, Stoltze K, Hjørting-Hansen E, et al. Implant surface preparation in the surgical treatment of experimental peri-implantitis with autogenous bone graft and ePTFE membrane in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(4):412-22.
60. Persson LG, Mouhyi J, Berglundh T, Sennerby L, Lindhe J. Carbon dioxide laser and hydrogen peroxide conditioning in the treatment of periimplantitis: an experimental study in the dog. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2004;6(4):230-8.

61. Wheelis SE, Gindri IM, Valderrama P, Wilson TG, Huang J, Rodrigues DC. Effects of decontamination solutions on the surface of titanium: investigation of surface morphology, composition, and roughness. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(3):329-40.
62. Monzavi A, Shahabi S, Fekrazad R, Behruzi R, Chiniforush N. Implant Surface Temperature Changes during Er:YAG Laser Irradiation with Different Cooling Systems. *J Dent (Tehran)*. 2014;11(2):210-5.
63. Schwarz F, Hegewald A, John G, Sahm N, Becker J. Four-year follow-up of combined surgical therapy of advanced peri-implantitis evaluating two methods of surface decontamination. *J Clin Periodontol*. 2013;40(10):962-7.
64. John G, Becker J, Schwarz F. Effectivity of air-abrasive powder based on glycine and tricalcium phosphate in removal of initial biofilm on titanium and zirconium oxide surfaces in an ex vivo model. *Clin Oral Investig*. 2016;20(4):711-9.
65. Keeve PL, Koo KT, Ramanauskaite A, Romanos G, Schwarz F, Sculean A, et al. Surgical Treatment of Periimplantitis With Non-Augmentative Techniques. *Implant Dent*. 2019;28(2):177-86.
66. El Chaar E, Almogahwi M, Abdalkader K, Alshehri A, Cruz S, Ricci J. Decontamination of the Infected Implant Surface: A Scanning Electron Microscope Study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2020;40(3):395-401.
67. Albrektsson T, Wennerberg A. On osseointegration in relation to implant surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21 Suppl 1:4-7.
68. Amengual-Peñafiel L, Brañes-Aroca M, Marchesani-Carrasco F, Jara-Sepúlveda MC, Parada-Pozas L, Cartes-Velásquez R. Coupling between Osseointegration and Mechanotransduction to Maintain Foreign Body Equilibrium in the Long-Term: A Comprehensive Overview. *J Clin Med*. 2019 Jan 25;8(2):139.doi: 10.3390/jcm8020139
69. Ma QL, Zhao LZ, Liu RR, Jin BQ, Song W, Wang Y, et al. Improved implant osseointegration of a nanostructured titanium surface via mediation of macrophage polarization. *Biomaterials*. 2014;35(37):9853-67.
70. Luu TU, Gott SC, Woo BW, Rao MP, Liu WF. Micro- and Nanopatterned Topographical Cues for Regulating Macrophage Cell Shape and Phenotype. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(51):28665-72.

71. Czumbel LM, Kerémi B, Gede N, Mikó A, Tóth B, Csupor D, et al. Sandblasting reduces dental implant failure rate but not marginal bone level loss: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2019 May 3;14(5):e0216428. doi: 10.1371/journal.pone.0216428.
72. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17 Suppl 2:68-81.
73. Bard DR, Dickens MJ, Smith AU, Zarek JM. Isolation of living cells from mature mammalian bone. *Nature*. 1972;236(5345):314-5.
74. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater*. 2012;24:1-17.
75. Fernandes RJ, Harkey MA, Weis M, Askew JW, Eyre DR. The post-translational phenotype of collagen synthesized by SAOS-2 osteosarcoma cells. *Bone*. 2007;40(5):1343-51.
76. Murray E, Provvedini D, Curran D, Catherwood B, Sussman H, Manolagas S. Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity. *J Bone Miner Res*. 1987;2(3):231-8.
77. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res*. 1987;47(18):4961-6.
78. Bilbe G, Roberts E, Birch M, Evans DB. PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone*. 1996;19(5):437-45.
79. Saldaña L, Bensiamar F, Boré A, Vilaboa N. In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. *Acta Biomater*. 2011;7(12):4210-21.
80. Matys J, Botzenhart U, Gedrange T, Dominiak M. Thermodynamic effects after Diode and Er:YAG laser irradiation of grade IV and V titanium implants placed in bone - an ex vivo study. Preliminary report. *Biomed Tech (Berl)*. 2016;61(5):499-507.

81. Caruso U, Nastri L, Piccolomini R, d'Ercole S, Mazza C, Guida L. Use of diode laser 980 nm as adjunctive therapy in the treatment of chronic periodontitis. A randomized controlled clinical trial. *New Microbiol.* 2008;31(4):513-8.
82. Liu R, Lei T, Dusevich V, Yao X, Liu Y, Walker MP, et al. Surface characteristics and cell adhesion: a comparative study of four commercial dental implants. *J Prosthodont.* 2013;22(8):641-51.
83. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
84. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
85. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004;329(1):77-84.
86. Lollobrigida M, Fortunato L, Serafini G, Mazzucchi G, Bozzuto G, Molinari A, et al. The Prevention of Implant Surface Alterations in the Treatment of Peri-Implantitis: Comparison of Three Different Mechanical and Physical Treatments. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Apr 11;17(8):2624. doi: 10.3390/ijerph17082624
87. Schwarz F, Ferrari D, Popovski K, Hartig B, Becker J. Influence of different air-abrasive powders on cell viability at biologically contaminated titanium dental implants surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88(1):83-91.
88. Cochis A, Fini M, Carrassi A, Migliario M, Visai L, Rimondini L. Effect of air polishing with glycine powder on titanium abutment surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(8):904-9.
89. Kushima SS, Nagasawa M, Shibli JA, Brugnera A, Rodrigues JA, Cassoni A. Evaluation of Temperature and Roughness Alteration of Diode Laser Irradiation of Zirconia and Titanium for Peri-Implantitis Treatment. *Photomed Laser Surg.* 2016;34(5):194-9.
90. Stubinger S, Etter C, Miskiewicz M, Homann F, Saldamli B, Wieland M, et al. Surface alterations of polished and sandblasted and acid-etched titanium implants after Er:YAG, carbon dioxide, and diode laser irradiation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25(1):104-11.

91. Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P, et al. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials*. 2000;21(15):1567-77.
92. Freitas GP, Lopes HB, Martins-Neto EC, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Effect of Surface Nanotopography on Bone Response to Titanium Implant. *J Oral Implantol*. 2016;42(3):240-7.
93. Karazisis D, Petronis S, Agheli H, Emanuelsson L, Norlindh B, Johansson A, et al. The influence of controlled surface nanotopography on the early biological events of osseointegration. *Acta Biomater*. 2017;53:559-71.
94. Palmquist A, Johansson A, Suska F, Brånemark R, Thomsen P. Acute inflammatory response to laser-induced micro- and nano-sized titanium surface features. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013;15(1):96-104.
95. Shapira L, Halabi A. Behavior of two osteoblast-like cell lines cultured on machined or rough titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(1):50-5.
96. Kadkhodazadeh M, Amid R, Gilvari Sarshari M, Mojahedi M, Parhizkar A. A comparison of human dental pulp stem cell activity cultured on sandblasted titanium discs decontaminated with Er:YAG laser and air-powder abrasion: an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2022 Jul 30. doi: 10.1007/s10103-022-03615-y.
97. Giannelli M, Bani D, Tani A, Materassi F, Chellini F, Sassoli C. Effects of an Erbium:Yttrium-Aluminum-Garnet Laser and Ultrasonic Scaler on Titanium Dioxide-Coated Titanium Surfaces Contaminated With Subgingival Plaque: An In Vitro Study to Assess Post-Treatment Biocompatibility With Osteogenic Cells. *J Periodontol*. 2017;88(11):1211-20.
98. Shibli JA, Silverio KG, Martins MC, Marcantonio júnior E, Rossa júnior C. Effect of air-powder system on titanium surface on fibroblast adhesion and morphology. *Implant Dent*. 2003;12(1):81-6.
99. Costa-Berenguer X, García-García M, Sánchez-Torres A, Sanz-Alonso M, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E. Effect of implantoplasty on fracture resistance and surface roughness of standard diameter dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29(1):46-54.



100. Toma S, Behets C, Brex MC, Lasserre JF. In Vitro Comparison of the Efficacy of Peri-Implantitis Treatments on the Removal and Recolonization of. *Materials (Basel)*. 2018 Dec 6;11(12):2484.doi: 10.3390/ma11122484.

101. Barrak FN, Li S, Muntane AM, Jones JR. Particle release from implantoplasty of dental implants and impact on cells. *Int J Implant Dent*. 2020 Sep 12;6(1):50.doi: 10.1186/s40729-020-00247-1



## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - FOU SP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação do potencial osteogênico de SAOS-2 crescidas em superfícies lisas de titânio após tratamentos para peri-implantite

**Pesquisador:** Natalia Caroline Aguiar Tartaroti

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 25140619.6.0000.0075

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.831.255

**Apresentação do Projeto:**

Os experimentos serão realizados no laboratório de Pesquisa Básica – Edmir Matson do Departamento de Dentística da FOU SP. Serão realizados experimentos de cultivo celular, com 10 amostras de células da linhagem SAOS-2, a serem doadas pelo Biobanco da FOU SP. Obtenção e cultura de SAOS. Será feita avaliação das respostas celulares Adesão e morfologia celular, Viabilidade celular e curva de crescimento, quantificação da atividade de Fosfatase alcalina, análise da expressão de genes marcadores ósseos por PCR em tempo real (RTPCR) e Formação de nódulos de matriz extracelular mineralizada.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo dessa pesquisa é avaliar o potencial osteogênico da SAOS-2 crescidas em superfícies de titânio (Ti) modificadas por diferentes tipos de tratamento. Secundariamente, espera-se caracterizar as diferentes superfícies de Ti tratadas de diferentes maneiras, avaliar a morfologia da linhagem celular SAOS-2 crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti tratadas ea, ainda, avaliar o potencial osteogênico da SAOS-2 crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti tratadas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há riscos e benefícios diretos do estudo já que o mesmo utilizará células pertencentes a um Biobanco, que serão doadas para o estudo.

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br



USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - FOU SP



Continuação do Parecer: 4.831.255

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa utilizará células da linhagem SAOS-2 doadas pelo Biobanco da FOU SP. A presente emenda trata de incluir uma aluna de iniciação científica, como membro da equipe de pesquisa, que será responsável pela realização do projeto, além de solicitar a ampliação do prazo de realização, em virtude da impossibilidade de realizar tal protocolo durante a pandemia. No projeto anexado, o prazo de execução laboratorial foi estendido 01 de setembro a 30 de novembro de 2021, com finalização do relatório com achados em julho de 2022.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Ver lista de pendências e inadequações.

**Recomendações:**

Ver lista de pendências e inadequações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

- Alterar as datas de execução do projeto na plataforma Brasil (CRONOGRAMA).

PENDÊNCIA ATENDIDA na submissão feita em 01 de junho de 2021.

Não há pendências adicionais.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente apreciados no CEP, conforme Norma Operacional CNS nº 001/13, item XI.2.d..

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "EMENDA", por meio da Plataforma Brasil, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação (Norma Operacional 001/2013 – letra H).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_175774_5_E1.pdf	01/08/2021 18:06:36		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	18/05/2021 18:19:32	Natalia Caroline Aguiar Tartaroti	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 da administração  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7960 E-mail: cepfo@usp.br



USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - FOUSP



Continuação do Parecer: 4.831.255

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	autorizacao.pdf	05/11/2019 12:31:48	Natalia Caroline Aguiar Tartaroti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	30/10/2019 13:08:07	Natalia Caroline Aguiar Tartaroti	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	22/10/2019 15:48:22	Natalia Caroline Aguiar Tartaroti	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 08 de Julho de 2021

---

**Assinado por:**  
**Alyne Simões Gonçalves**  
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 da administração  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7960 E-mail: cepfo@usp.br