

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

---

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA

**"Influência da texturização de superfícies de Zircónia por laser  
Nd:YAG à nano e micro escala no comportamento celular de  
fibroblastos"**

**Ana Filipa Silva Marques**

Orientadores:

Professora Doutora Joana Rita Oliveira Faria Marques

Professor Doutor António Duarte Sola Pereira da Mata

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2020



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

---

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA

**"Influência da texturização de superfícies de Zircónia por laser  
Nd:YAG à nano e micro escala no comportamento celular de  
fibroblastos"**

**Ana Filipa Silva Marques**

Orientadores:

Professora Doutora Joana Rita Oliveira Faria Marques

Professor Doutor António Duarte Sola Pereira da Mata

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2020



## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Joana Marques, orientadora deste trabalho, o meu mais profundo agradecimento por toda a paciência, tempo e conhecimento partilhado nestes últimos anos. Sem o seu apoio e dedicação não teria sido possível.

Ao Professor Doutor António Mata, coorientador e Investigador Principal do GIBBO, exemplo de conhecimento e dedicação incansável à área científica. Obrigada pela oportunidade de poder fazer parte deste grupo que fundou e acarinhou durante todos estes anos.

Ao Professor Doutor Duarte Marques, um obrigada pelo exemplo de dedicação, pela sua exigência e por investir sempre nos mais novos.

À Professora Doutora Mariana Cruz, por toda a sua ajuda, disponibilidade, exigência, incentivo e boa disposição durante este percurso. Foi um prazer poder aprender consigo e trabalhar a seu lado.

Um muito obrigada a todos os outros membros do GIBBO, por todos os momentos, por todas as palavras e por me terem acolhido, ensinado e motivado tanto ao longo destes anos. Um especial agradecimento à Carlota, à Rita, à Andreia, à Susana, ao Ricardo e à Beatriz pelo exemplo e amizade. À Neusa um muito obrigado pela amizade e por toda a ajuda e paciência para me ouvir durante os últimos meses.

A todos os colegas que me têm vindo a aturar durante estes anos, que foram dos mais difíceis e desafiantes, mas sempre recompensadores. Foi um prazer partilhá-los convosco.

À minha família, que sempre me apoiou e me deu a possibilidade de ter mais e melhor do que eles tiveram. Obrigada por todo o apoio, compreensão e pela exigência que me incutiram desde sempre.

Ao Rúben, por ao longo destes anos ter estado sempre presente. Daqui a nada serás tu.

Este trabalho foi apoiado pela FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia – Portugal) no âmbito do projeto FunImp 01-0145-FEDER-030498.

Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional

**FCT** Fundação  
para a Ciência  
e a Tecnologia



## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar o comportamento celular de fibroblastos (HGF-hTERT) em superfícies de Zircónia texturizadas por laser Nd:YAG comparativamente com superfícies convencionalmente texturizadas por jateamento e ataque ácido.

**Métodos:** Prepararam-se discos de Zircónia e distribuíram-se aleatoriamente pelos grupos em estudo (N=12): sem tratamento (Grupo A); jateamento e ataque ácido (Grupo B); texturização por laser Nd:YAG espaçamento de 10 µm/ 10 passagens (Grupo C); texturização por laser Nd:YAG espaçamento de 20 µm/1 passagem (Grupo D). Cultivaram-se HGF-hTERT nestas superfícies. A viabilidade celular foi avaliada aos 1, 3 e 7 dias usando um método à base de resazurina. A morfologia e adesão celulares foram analisadas por microscopia de fluorescência e microscopia eletrónica de varrimento (FEG-SEM) aos 1 e 3 dias. A produção de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1β (IL-1β) foi medida aos 1 e 3 dias por ensaios enzimáticos de imunoabsorção (ELISA). Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Realizaram-se comparações entre grupos por ANOVA unidirecional e de medidas repetidas (teste post-hoc de Tukey) usando um software de estatística. A significância foi definida como  $p < 0,05$ .

**Resultados:** A viabilidade celular aumentou ao longo do tempo para todos os grupos. Aos 1 e 7 dias verificaram-se valores de viabilidade significativamente superiores no Grupo C comparativamente ao Grupo B ( $p < 0,05$ ). As imagens de microscopia revelaram adesão em ambos os tempos, com morfologia normal e prolongamentos celulares sobre as superfícies de todos os discos. Observou-se um maior número de células aderidas nos Grupos C e D do que nos outros grupos, em ambos os tempos. Não foram observadas diferenças na produção de IL-6 e IL-1β entre os grupos em estudo ( $p > 0,05$ ).

**Conclusões:** As superfícies implantares de Zircónia texturizadas por laser parecem beneficiar a resposta de fibroblastos comparativamente a superfícies tratadas com jateamento e ataque ácido. Mais estudos devem ser realizados para validar esta técnica de texturização.

**Palavras-Chave:** “fibroblastos gengivais humanos”, “Zircónia”, “laser”, “implantes dentários”

## ABSTRACT

**Objectives:** To evaluate fibroblast behavior (HGF-hTERT) in Zirconia Nd:YAG laser textured surfaces compared to sandblasted and acid etched surfaces.

**Methods:** Zirconia discs were prepared and randomly distributed among the study groups (N = 12): without treatment (Group A); sandblasting and acid etching (Group B); texturing by Nd:YAG laser spacing of 10  $\mu\text{m}$  / 10 passages (Group C); texturing by Nd:YAG laser spacing of 20  $\mu\text{m}$  / 1 passage (Group D). HGF-hTERT were grown on these surfaces. Cell viability was assessed at 1, 3 and 7 days using a resazurin-based method. Cell morphology and adhesion were analyzed by fluorescence microscopy and scanning electron microscopy (FEG-SEM) at 1 and 3 days. The production of interleukin 6 (IL-6) and interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) was measured at 1 and 3 days by enzyme immunosorbent assays (ELISA). The results were presented as mean  $\pm$  standard deviation. Comparisons between groups were performed by unidirectional and a repeated measures ANOVA (Tukey's post-hoc test) using statistical software. Significance was defined as  $p < 0.05$ .

**Results:** Cell viability increased over time for all groups. At 1 and 7 days, viability values were significantly higher in Group C compared to Group B ( $p < 0.05$ ). Microscopy images revealed adhesion at both times, with normal morphology and cellular extensions on the surfaces of all discs. A greater number of adhered cells was observed in Groups C and D than in the other groups, at both times. There were no differences in the production of IL-6 and IL-1 $\beta$  between the study groups ( $p > 0.05$ ).

**Conclusions:** Laser textured Zirconia implant surfaces appear to benefit the fibroblast response compared to surfaces treated with sandblasting and acid etching. Further studies must be carried out to validate this texturing technique.

**Key words:** “human gingival fibroblasts”, “Zirconia”, “laser”, “dental implants”

# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1. MATERIAIS .....	3
2. SUPERFÍCIES.....	5
2.1 <i>Técnicas de Texturização</i> .....	6
3. MODELOS DE INTEGRAÇÃO DE TECIDOS MOLES <i>IN VITRO</i> .....	8
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
1. PRODUÇÃO E CARATERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	11
2. CULTURAS CELULARES.....	13
2.1 <i>Viabilidade celular e Ensaio de proliferação</i> .....	14
2.2 <i>Quantificação IL-1<math>\beta</math> por método de ELISA</i> .....	14
2.3 <i>Quantificação IL-6 por método de ELISA</i> .....	15
3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARRIMENTO (FEG-SEM) E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	15
3.1 <i>Microscopia de fluorescência</i> .....	15
3.2 <i>Microscopia eletrônica de varrimento (FEG-SEM)</i> .....	16
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	16
4.1 <i>Cálculo da dimensão amostral e poder estatístico</i> .....	17
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
1. PROPRIEDADES FÍSICAS DAS SUPERFÍCIES .....	18
2. CULTURAS E COMPORTAMENTO CELULAR.....	20
2.1 <i>Viabilidade</i> .....	20
2.2 <i>Interleucina 1<math>\beta</math> e Interleucina 6</i> .....	21
2.3 <i>Morfologia Celular – Fluorescência</i> .....	22
2.4 <i>Morfologia Celular (SEM)</i> .....	22
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>31</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>37</b>

## ÍNDICES DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

<b>Tabela 1</b> – Descrição das amostras utilizadas. ....	11
<b>Tabela 2</b> - Valores de rugosidade- $R_a$ ( $\mu\text{m}$ ) das superfícies das amostras de cada grupo, apresentados como média e desvio padrão. ....	19
<b>Gráfico 1</b> - Resultados de viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos A (sem tratamento), B (jateamento e ataque ácido), C (laser D10 P10 V256), D (laser D20 P1 V256) e controlo positivo (incluído meramente para validação das condições experimentais) aos 1, 3 e 7 dias de cultura (n=12). Significância estatística apresentada: * $P < 0.05$ .....	20
<b>Gráfico 2 e 3</b> - Média obtida da concentração de Interleucina 6 (3) e $1\beta$ (4), em pg/mL, na cultura de fibroblastos em todos os grupos de estudo (n=8 por grupo) às 24 horas e 3 dias de cultura. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão em valores pg/mL. Controlo positivo incluído meramente para validação das condições experimentais. Significância estatística apresentada: * $P < 0.05$ .....	21
<b>Figura 1</b> – Esquema ilustrativo das amostras produzidas e do padrão de laser realizado para a texturização das amostras de laser: grelha obtida através da passagem de feixes de laser a distâncias de 10 $\mu\text{m}$ (Grupo C) e 20 $\mu\text{m}$ (Grupo D). ....	12
<b>Figura 3</b> - Imagens de FEG-SEM das superfícies das amostras dos vários grupos após o tratamento da superfície e sinterização com uma ampliação de 120x, 500x e 1000x.....	18
<b>Figura 4</b> – Imagens de microscopia de fluorescência. obtidas de amostras fixadas às 24 horas e 3 dias para cada um dos grupos. Coloração dos citoplasmas, recorrendo a Faloidina ( filtro EX/Em = 493/517nm WIB) e os núcleo celulares, recorrendo Iodeto de Propídeo (EX/Em = 535/617nm WG). Ampliação 400x. ....	22
<b>Figura 4</b> - Imagens de SEM com fibroblastos cultivados nas superfícies das amostras de todos os grupos em estudo ao 1 dia e 3 dias de cultura com ampliação de 120x, 500x e 5000x. ....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS

**°C** – Graus Celsius

**µl** – Microlitro

**µm** – Micrómetro

**cm** – Centímetro

**CMEMS** – Unidade de Investigação em Microsistemas Eletromecânicos da Universidade do Minho

**DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DP** – Desvio Padrão

**ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimática

**FEG-SEM** – Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy

**FMDUL** – Faculdade de Medicina Dentária de Lisboa

**HGF-hTERT** – Human Gingival Fibroblast - human telomerase reverse transcriptase

**HA** – Hidroxiapatite

**IL** – Interleucina

**kHz** – Quilohertz

**Laser** – Light amplification by stimulated emission of radiation

**mJ** – Microjoule

**mm/s** – Milímetros por segundo

**Nd:YAG** – Neodymium-doped yttrium aluminum garnet

**nm** – Nanómetro

**PBS** – Tampão fosfato salino

**PEEK** – Poly-ether-ether-ketone

**pg/mL** – Picograma por mililitro

**Ra** – Rugosidade de superfície

**SLC** – Sisma Laser Controller

**TC** – Tecido conjuntivo



## INTRODUÇÃO

A presença de zonas edêntulas origina problemas funcionais e estéticos, pelo que a sua reabilitação recorrendo a implantes dentários é, atualmente, uma opção de tratamento bem fundamentada e aceite.<sup>(1-4)</sup>

Existe registo da utilização de implantes dentários na reabilitação oral desde os primeiros Egípcios e nas culturas da América do Sul Central.<sup>(3)</sup> Desde então, e graças aos desenvolvimentos tecnológicos e biológicos, o conhecimento nesta área avançou consideravelmente, tendo vindo a ser cada vez mais estudada e aplicada.

No entanto, foi apenas na década de 60 que se deu o maior avanço na terapia de implantes, quando Brånemark descreveu a ancoragem óssea direta de implantes metálicos, tendo-se posteriormente referido a este fenómeno como Osteointegração em 1977.<sup>(4)</sup> A primeira definição para este conceito apenas foi publicada em 1981 por Thomas Albrektsson, classificando a osteointegração como sendo um *“contacto direto entre a superfície de um implante e o osso, sob carga, à resolução de microscopia ótica”*.<sup>(4-6)</sup> Este processo é a consequência de uma cascata de eventos celulares e moleculares que ocorrem após a preparação do leito implantar e da colocação do implante, levando à aposição de osso recém-formado diretamente na superfície implantar, permitindo uma fixação rígida e clinicamente assintomática.<sup>(7)</sup> Mais recentemente a osteointegração foi definida por Albrektsson e Sennerby<sup>(8)</sup> como uma *“conexão direta funcional e estrutural entre o osso vivo e a superfície de um implante sobre carga”*.

Dada a importância da osteointegração no sucesso da terapia com implantes, têm vindo a ser realizados uma grande quantidade de estudos com o objetivo de melhorar a quantidade, rapidez e previsibilidade deste processo, recorrendo à procura de novos materiais e técnicas de preparação de superfícies implantares.<sup>(1,3,6,7,9)</sup>

No entanto, os tecidos peri-implantares não são apenas circundados por tecidos duros, possuem também tecidos moles que desempenham um papel importante no sucesso da terapia de implantes. Enquanto os tecidos duros têm como função o estabelecer uma relação de contacto com a superfície do implante, assegurando a sua estabilidade, os tecidos moles, denominados *“mucosa peri-implantar”*, são formados durante a cicatrização que ocorre após a colocação do implante e do pilar e têm como função isolar o osso/implante do meio oral, protegendo-o da contaminação bacteriana, evitar a ocorrência de recessão gengival, reabsorção

óssea por inflamação e migração epitelial (sendo crucial ao limitar a proliferação do epitélio ao longo da superfície implantar).<sup>(8,10-14)</sup>

Em saúde, os tecidos peri-implantares apresentam uma espessura de 3-4 mm desde a margem gengival à crista óssea e possuem um núcleo de tecido conjuntivo (TC) composto sobretudo por fibras de colagénio e elementos de matriz e com uma menor quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos, quando comparado com o TC em torno do dente.<sup>(8)</sup> A mucosa peri-implantar possui na sua porção externa (oral) um epitélio oral, coberto por epitélio queratinizado; na porção da mucosa em contacto com o implante (pilar) encontram-se, coronalmente, o epitélio sulcular e um fino epitélio de barreira, aderido à superfície do implante (pilar) através de hemidesmossomas que ligam as células epiteliais à lâmina basal, com uma extensão de 2 mm e, até 1-1,5 mm da crista óssea. Do limite apical do epitélio de barreira à crista óssea encontra-se a zona de inserção conjuntiva, na porção mais apical da mucosa peri-implantar. A inserção conjuntiva em torno do implante é caracterizada por ser pobre em células, possuindo um baixo número de fibroblastos (inferior ao presente no tecido periodontal), ligados de forma mais fraca à superfície, pobre em vascularização quando comparado com o tecido conjuntivo em redor do dente, e rico em fibras de colagénio, no entanto estas têm uma orientação paralela à superfície do pilar visto que não existe cimento que permite a inserção das fibras na superfície do dente.<sup>(8,11,15-17)</sup>

A mucosa peri-implantar é, portanto, muito semelhante a um tecido cicatricial, constituindo uma barreira menos resistente, pelo que se torna mais suscetível à inflamação e menos eficaz na proteção do osso alveolar.<sup>(8,11,12,16-18)</sup>

Tal como em torno de um dente, quando ocorre acumulação de biofilmes bacterianos em torno de implantes osteointegrados pode desenvolver-se um quadro inflamatório, levando ao surgimento da chamada mucosite peri-implantar, definida como *“inflamação sem perda continuada de osso marginal peri-implantar”*.<sup>(19)</sup> Caso esta não seja tratada e comece a afetar o tecido conjuntivo e o osso, a doença passa a denominar-se peri-implantite, definida como *“existência de inflamação na mucosa peri-implantar com perda óssea progressiva de osso de suporte”*.<sup>(20)</sup>

A doença periodontal é reconhecida como uma das principais responsáveis pela perda de implantes pelo que tem vindo a crescer o interesse pela interface entre os implantes e os tecidos moles de forma a criar condições que permitam melhorar o sucesso da reabilitação com implantes através de um correto selamento conjuntivo do tecido gengival ao pilar.<sup>(11,13-16,18,21)</sup>

As propriedades de superfície dos implantes influenciam a adesão e diferenciação das células que os rodeiam, incluindo a dos fibroblastos gengivais, responsáveis por sintetizar muitos dos componentes da matriz extracelular e pela constante adaptação do TC gengival, reparação e regeneração dos tecidos. <sup>(13,14,18)</sup>

Como tal, melhorar a quantidade e bioatividade dos fibroblastos durante a cicatrização dos tecidos moles peri-implantares é, por isso, muito importante de forma a garantir e melhorar o selamento transmucoso no pilar do implante, permitindo aumentar a estabilidade e qualidade dos tecidos moles o que poderá levar a um maior sucesso a longo termo da reabilitação com implantes. Para tal, têm vindo a ser realizados vários estudos que pretendem otimizar os materiais e topografia das superfícies utilizados. <sup>(11,12,14,15,18)</sup>

## 1. Materiais

O material utilizado nos implantes é um dos principais fatores que influenciam a resposta dos tecidos duros <sup>(6)</sup> e dos tecidos moles. <sup>(15,22)</sup> Atualmente são o Titânio e as suas ligas, a Zircónia e as ligas de Titânio-Zircónio (*Straumann Roxolid*), os materiais mais utilizados no fabrico de implantes, havendo também um interesse no PEEK (*poly-ether-ether-ketone*), um polímero desenvolvido mais recentemente. <sup>(3,9,23)</sup>

Destes, o Titânio foi o primeiro e continua a ser muito utilizado, tanto em implantes dentários como ortopédicos. <sup>(2,3,7,15)</sup> Este é usado na sua forma pura e sob a forma de liga. O titânio puro disponível comercialmente é classificado em 4 graus que diferem no conteúdo de oxigénio e nos contaminantes presentes, tendo o Grau 4 a maior quantidade de oxigénio (0,4%) e o Grau 1 a menor quantidade (0.18%).<sup>(24)</sup> Das ligas, a mais utilizada é a Ti-6Al-4V, sendo também de realçar a liga de Titânio e Zircónio (*Straumann Roxolid*, TiZr1317). <sup>(3)</sup>

O Titânio e as suas ligas apresentam vantagens ao nível das suas características físicas, químicas e mecânicas, boa biocompatibilidade (ocorre formação de uma camada de óxido estável quando em contacto com o ar, que também lhe confere uma boa resistência à corrosão) <sup>(24)</sup> e alta resistência ao stress por fadiga. <sup>(3,9,25)</sup> No entanto, o Titânio e as suas ligas apresentam um módulo de elasticidade superior ao do osso (baixa proteção contra *stress*, podendo resultar em reabsorção óssea e/ou fratura implantar)<sup>(23-25)</sup>, podem ainda encontrar-se associados a casos de hipersensibilidade e alergias (sobretudo no caso das ligas de titânio), pode ocorrer degradação da superfície por galvanização, dispersão de radiação e ainda problemas estéticos (resultantes de recessão e/ou translucidez gengival em biótipos gengivais finos). <sup>(9,24,26,27)</sup>

De forma a diminuir os problemas estéticos e de biocompatibilidade que os implantes de Titânio pareciam causar, surgiram no final da década de 60 os materiais à base de cerâmica nomeadamente o Óxido de Alumínio ou Alumina, como opção para o fabrico de implantes. Estas apresentavam como vantagens face ao Titânio o seu comportamento biologicamente inerte e as suas boas características físicas e químicas, como a baixa condutividade térmica e elétrica. No entanto, certas propriedades das cerâmicas utilizadas inicialmente, como a baixa ductilidade e a sua fragilidade (baixa resistência à flexão) vieram a limitar o seu uso. No entanto, no início dos anos 90, com a introdução do Óxido de Zircónio como material na Medicina Dentária, as cerâmicas voltaram a ser consideradas como opção. <sup>(3,28)</sup>

O óxido de Zircónio, também chamado simplesmente Zircónia, é um composto inorgânico derivado do elemento Zircónio (Zr), um elemento químico pertencente ao grupo dos metais de transição, semelhante ao Titânio e ao Háfnio. A Zircónia possui três fases cristalinas distintas: monoclinica, cúbica e tetragonal, sendo a última a utilizada clinicamente. <sup>(29)</sup>

Atualmente utiliza-se o elemento químico Ítrio (Y) como reforço, de forma a aumentar a resistência ao envelhecimento da Zircónia, formando Zircónia tetragonal policristalina estabilizada com Ítrio (Y-TZP). Este é um material bioinerte com elevadas propriedades mecânicas (elevada resistência à fratura e flexão), elevada estabilidade química (alta resistência à corrosão), eletricamente neutro, baixa condutividade térmica e boa biocompatibilidade, visto estar associada a uma reduzida formação de biofilmes bacterianos em estudos *in vitro* e pela sua cor branca, que a torna esteticamente superior comparativamente à cor acinzentada do Titânio, sendo por todas estas razões cada vez mais utilizada em pilares e implantes dentários. <sup>(27-31)</sup>

A capacidade destes materiais na formação de um bom selamento dos tecidos moles em torno implante parece variar, sendo que a literatura existente aponta cada vez mais para a existência de resultados iguais superiores para a Zircónia comparativamente ao Titânio. Numa revisão recente de estudos histológicos em animais, o Titânio e a Zircónia aparentaram ter um processo de cicatrização em torno dos implantes semelhante nos estudos analisados. <sup>(32)</sup> Noutra revisão de estudos clínicos em humanos foi concluído que o material do pilar possui um impacto significativo na saúde dos tecidos, sendo que, quando comparada com o Titânio, a Zircónia apresentou uma menor acumulação de placa bacteriana e um menor nível de inflamação. <sup>(15)</sup> Estudos *in vitro* parecem sugerir a existência de uma melhor taxa de proliferação e adesão de

fibroblastos na Zircónia do que no Titânio. <sup>(22,33)</sup> Como tal tem havido um crescente interesse na utilização da Zircónia como material para o fabrico de implantes dentários.

## 2. Superfícies

A superfície é outro dos parâmetros considerados importantes no sucesso da terapia com implantes <sup>(6,31,34)</sup> Este parâmetro tendo vindo a ser alvo de interesse sobretudo devido ao desejo de reduzir o tempo da cicatrização óssea de forma a aumentar a estabilidade primária e permitir uma carga precoce dos implantes. <sup>(5)</sup> No entanto, também parece influenciar a adesão dos tecidos moles à superfície implantar. <sup>(11-15,18,21,22,33)</sup>

As propriedades das superfícies podem dividir-se em: topográficas (macro e micro topografia), químicas, mecânicas e físicas (cristalinidade e hidrofiliabilidade); todas relacionadas e dependentes entre si, sendo que alteração numa delas provoca uma modificação nas restantes). <sup>(5)</sup>

A topografia existente numa superfície à microescala é denominada de rugosidade. No entanto este é um termo ambíguo e classificado de diferentes formas na literatura, o que dificulta muitas vezes a comparação de superfícies entre estudos. <sup>(35)</sup> Wenneberg et al <sup>(24)</sup>, considerou o termo liso o utilizado para descrever a rugosidade ( $R_a$ ) de pilares, e os termos rugosidade mínima (0,5 a 1  $\mu\text{m}$ ), rugosidade intermédia (1 a 2  $\mu\text{m}$ ), os mais utilizados atualmente, e rugoso (2 a 3  $\mu\text{m}$ ), para a superfície dos implantes. Há também outros estudos que classificam como lisas rugosidades de superfície médias inferiores ou iguais a 1  $\mu\text{m}$  e rugosas as que são superiores a 1  $\mu\text{m}$ . <sup>(24)</sup>

É sugerido pela literatura que as micro-rugosidades providenciam uma melhor interligação biomecânica e que a nano-rugosidade permite um maior número de locais de adesão para as proteínas iniciais que irão entrar em contacto com a superfície do implante <sup>(5)</sup>, podendo influenciar também a adesão e comportamento celular. <sup>(12)</sup>

Superfícies mais rugosas parecem acelerar e melhorar a osteogénese por contacto, influenciando o comportamento celular, e melhorar a distribuição de forças (pelo aumento da superfície de contacto). <sup>(7,31,35,36)</sup> No caso dos osteoblastos, modificações como a criação de nanotopografia e aumento da rugosidade têm vindo a ser associadas a um aumento na adesão e diferenciação celular. <sup>(37)</sup> Sendo que a evidencia demonstra que o valor ótimo de  $R_a$  para a fixação de um implante é entre 1-1,5 $\mu\text{m}$  <sup>(25)</sup>, sendo 1,5  $\mu\text{m}$  o valor sugerido para uma rápida osteointegração, <sup>(36)</sup> ou seja, uma rugosidade intermédia. <sup>(24)</sup>

Nos tecidos moles a literatura sugere resultados diferentes. Vários estudos *in vitro* <sup>(11-13,18)</sup> sugerem que fibroblastos parecem ter mais afinidade por superfícies lisas ou com leves sulcos à microescala, demonstrando algum efeito da rugosidade no comportamento das células dos tecidos moles. Num estudo de Kearns et al <sup>(38)</sup> é referida a necessidade de uma certa rugosidade de superfície ( $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ ) de forma a garantir um bom selamento desta zona, sugerindo ainda que superfícies lisas poderão permitir a formação de uma adesão e proliferação excessiva de células epiteliais. Um outro estudo realizado por Ponsonnet et al <sup>(39)</sup> avaliando vários tipos de Titânio, com diferentes rugosidades de superfície, foi concluído que quanto maior a rugosidade, menor a proliferação dos fibroblastos e que o intervalo ótimo para a rugosidade parece ser entre os 0,08 e  $1 \mu\text{m}$ , acima do qual a proliferação celular se torna difícil. <sup>(22)</sup>

No entanto há outro fator a ter em consideração quando se fala na interface com os tecidos moles: a formação de biofilme. Sendo que as superfícies utilizadas devem também ter uma rugosidade que procure evitar uma adesão aumentada de biofilme, visto que este possui, um efeito negativo na saúde dos tecidos. <sup>(15,18)</sup> Sendo que atualmente alguns estudos apontam uma  $R_a < 0,2 \mu\text{m}$  para diminuir a colonização bacteriana. <sup>(25)</sup>

Apesar de não haver um consenso claro quanto à existência de uma rugosidade ideal para a garantia da formação de uma adequada interface do implante com os tecidos moles, existe evidência na literatura <sup>(11,21,22)</sup> de que diferentes tipos de modificações de superfície de pilares de implantes que parecem fornecer um benefício para a união do tecido conjuntivo. Como tal têm-se vindo a testar várias técnicas de texturização que permitam obter características de superfícies ideais para a interface com os tecidos moles.

## **2.1 Técnicas de Texturização**

A micro e nanotexturização de implantes maquinados, tem sido produzida através de tratamentos subtrativos e aditivos. Os processos aditivos incluem recobrimento das superfícies com spray de plasma, hidroxiapatite (HA) e fosfato de cálcio, deposição de iões e sinterização de pó de titânio. Processos subtrativos, que são atualmente os mais utilizados, compreendem jateamento, ataque ácido, oxidação, polimento elétrico, anodização, polimento mecânico e microtexturização a laser. <sup>(5,7)</sup>

A técnica de jateamento abrasivo com ataque ácido é atualmente considerada o *gold standard* na preparação de superfícies implantares para a interface com os tecidos duros <sup>(40)</sup>, sendo que o primeiro é utilizado para criar uma superfície moderadamente rugosa e o ataque

ácido permite a formação de uma rugosidade à micro e nanoescala, melhorando o processo de cicatrização óssea após a colocação do implante. <sup>(5,35)</sup> No entanto, este tratamento de superfície apresenta desvantagens, nomeadamente a presença de contaminantes na superfície implantar e o facto de originarem superfícies com topografia mal definida e com composições químicas variadas. <sup>(7,40,41)</sup>

No caso dos tecidos moles, a superfície considerada *gold standard* é o Titânio maquinado <sup>(22,32)</sup>, sendo que têm vindo a surgir outros tratamentos com melhores resultados face a este, nomeadamente a modificação química, formação de microsulcos, anodização <sup>(32)</sup>, colagénio, polimento elétrico, limpeza por plasma e texturização por laser. <sup>(22)</sup>

Dado os resultados favoráveis do laser tanto para a interface com os tecidos duros como os tecidos moles, tem vindo a crescer o interesse pela texturização por laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) para a preparação de superfícies implantares. <sup>(40,42,43)</sup>

Este tipo de texturização é realizada através da emissão de pulsos com um determinado comprimento de onda que, ao atingir a superfície, levam a um aumento da sua temperatura. No caso das cerâmicas, consoante a amplitude do feixe, poderão ser desencadeados diferentes efeitos físicos: fusão, sublimação, vaporização, dissociação, formação de plasma e ablação, o que leva à formação do padrão. <sup>(44)</sup>

Existem vários tipos de laser, podendo estes classificar-se em: lasers de estado sólido (ex.: Nd:YAG, *Neodymium-doped yttrium aluminum garnet* e o Ti-safira), lasers de gás (ex: CO<sub>2</sub> e laser de Excímero), lasers líquidos, lasers semicondutores e laser de eletrão livre (FEL). <sup>(44,45)</sup> Os diferentes tipos de laser podem ainda ser utilizados em modo contínuo, onde é emitido um fluxo constante de luz, ou em modo pulsado (nano, micro, pico e femtosegundo), em que ocorre uma interrupção da luz entre dois pulsos sucessivos. <sup>(44)</sup>

Cada tipo de laser possui um comprimento de onda de emissão específico dependente da sua constituição, devendo ser adequado às características do material a modificar. Tendo isto em conta, o laser Nd:YAG apresenta um comprimento de onda de emissão elevado (1064 nm) <sup>(45)</sup>, mais indicado para metais, no entanto também é utilizado na texturização de cerâmicas devido à sua alta densidade e foco pequeno e pontual. <sup>(40)</sup> Lasers pulsados são mais adequados para texturização de cerâmicas pois permitem controlar melhor os parâmetros de processamento quando comparado com um laser de modo contínuo. <sup>(44,45)</sup>

Esta técnica tem vindo a ser utilizada com sucesso na Zircónia <sup>(27,40,46)</sup>, visto que reduz o dano mecânico provocado pelos tratamentos de superfície <sup>(27)</sup> enquanto leva à formação de uma topografia rugosa à micro e nano escala, semelhante à originada pelo ataque ácido. Além disso melhora a molhabilidade e aumenta a rugosidade da superfície sem necessidade de contactar com a superfície e, por isso, sem contaminação da mesma, de forma rápida, com pouco desperdício e facilmente replicável, o que constituem vantagens à sua utilização. <sup>(40,47)</sup>

Apesar de todos os aspetos positivos, ocorrem alguns efeitos indesejáveis como a diminuição da resistência ao choque térmico (que pode levar à iniciação e propagação de microfissuras), a criação de “salpicos” e de zonas afetadas pelo calor, que ocorrem quando este é utilizado na texturização de materiais duros e frágeis, tal como Zircónia sinterizada. Estes micro-danos aceleram o envelhecimento da Zircónia visto destabilizarem a sua fase tetragonal e transformarem-na em monoclinica, o que leva à progressiva deterioração do material e consequente aumento da suscetibilidade à fratura. <sup>(40,47,48)</sup> Como tal, a texturização de Zircónia com laser antes da sua sinterização tem vindo a ser investigada e a apresentar resultados favoráveis na literatura. <sup>(40)</sup>

A utilização de texturização por laser em implantes tem vindo a ser testada e tem apresentado vantagens tanto na integração dos tecidos duros <sup>(41,42,46)</sup>, como para os tecidos moles. <sup>(22,33,49,50)</sup> No entanto a evidência disponível para os tecidos moles ainda é escassa e os estudos existentes muitas vezes falham na descrição dos materiais e métodos utilizados, dificultando a comparação entre eles. <sup>(22)</sup>

Dadas as vantagens da texturização por laser, é de interesse continuar a investigar as suas potencialidades para a produção de superfícies implantares, nomeadamente para a interface com os tecidos moles, de forma a tornar cada vez mais simples e previsível o fabrico de implantes e até melhorar a resposta biológica dos tecidos, permitindo uma melhor integração dos implantes na cavidade oral.

### **3. Modelos de Integração de Tecidos Moles *in vitro***

Para tal, têm vindo a ser utilizados vários modelos experimentais, procurando estudar a capacidade de união do TC à superfície implantar (pilar). Nestes estudos são geralmente utilizados fibroblastos gengivais humanos (HGF). <sup>(22)</sup> De forma a simular adequadamente as condições intraorais, as células utilizadas são muitas vezes linhagens primárias, obtidas a partir de tecidos orais normais. No entanto, estas linhagens apresentam algumas limitações, tais como um tempo de vida útil limitado em cultura seriada e instabilidade genómica em passagens

tardias. Como tal, vários estudos utilizam células imortalizadas, como HGF hTERT (imortalizados através da transfecção do gene da transcriptase reversa da telomerase humana), que não apresentam estes problemas enquanto mantêm as suas características biológicas, fenotípicas e potencial replicativo. <sup>(51)</sup>

Apesar das limitações dos estudos *in vitro*, visto não permitirem uma extrapolação direta de resultados para a prática clínica, estes são essenciais visto constituírem muitas vezes o primeiro passo para a validação biológica de dispositivos médicos, prévia a estudos *in vivo* pré-clínicos que permitem a validação de novos materiais e técnicas, em estudos animais. <sup>(22)</sup>

## OBJETIVOS

É reconhecida atualmente a necessidade de otimizar as superfícies implantares em contacto com os tecidos moles de forma a garantir um bom selamento dos mesmos. Tendo em conta as vantagens que a Zircónia como material e as técnicas mais atuais de texturização por laser têm vindo a apresentar na literatura, surgiu esta dissertação, que tem como objetivo avaliar o comportamento de fibroblastos em superfícies Zircónia texturizadas por laser com um padrão semelhante ao obtido no jateamento e ataque ácido, mas tendo em conta as vantagens inerentes da utilização do laser.

Com este objetivo e no âmbito de uma colaboração entre a Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa e a Unidade de Investigação em Microssistemas Eletromecânicos (*Center for MicroElectroMechanics Systems - CMEMS*) da Universidade do Minho, foram desenvolvidas amostras recorrendo à utilização de laser Nd:YAG para texturização de Zircónia, com criação de micro e nanotopografia, procurando mimetizar a obtida através de jateamento e ataque ácido.

De forma a cumprir este objetivo, definiu-se o seguinte objetivo específico e as suas hipóteses:

Avaliar a influência da utilização de diferentes técnicas de texturização de Zircónia (laser ou jateamento e ataque ácido) no comportamento celular.

H0: A texturização por laser não influencia o comportamento celular *in vitro* de fibroblastos humanos.

H1: A texturização por laser influencia o comportamento celular *in vitro* de fibroblastos humanos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Produção e caracterização das amostras

As amostras utilizadas durante o trabalho foram obtidas numa parceria com a Universidade do Minho, tendo as mesmas sido desenvolvidas, produzidas e caracterizadas quanto às suas características físicas e mecânicas na Unidade de Investigação em Microssistemas Eletromecânicos da Universidade do Minho (CMEMS). Todos os passos de caracterização biológica descritos foram realizados no Laboratório de Cultura Celular da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa (FMDUL).

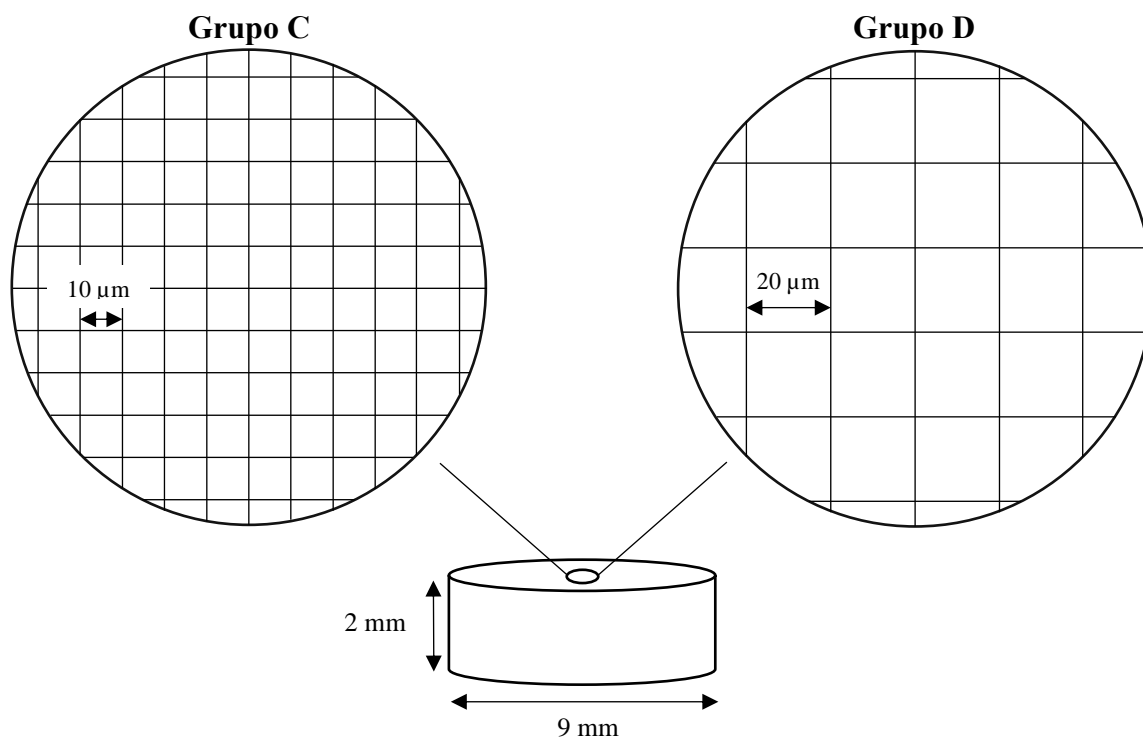
Foram obtidos discos de Zircónia ( $ZrO_2$ ) a partir do pó de 3Y-TZP prensado a frio (Tosoh Corporation<sup>®</sup>, Amesterdão, Holanda), obtendo um total de 48 discos com um diâmetro de 10 mm e 2,5 mm de altura, antes da sinterização.

Após a sua produção, os discos de Zircónia foram distribuídos aleatoriamente pelos grupos descritos na Tabela 1, sendo que 12 foram deixados sem tratamento (Grupo A), 12 foram tratados com jateamento e ataque ácido (Grupo B), servindo como controlo, e os restantes foram maquinados por laser com duas texturas distintas (Grupos C e D).

*Tabela 1 – Descrição das amostras utilizadas, sendo que D corresponde à distância entre passagens em  $\mu m$  utilizada e o P corresponde ao número de passagens.*

<i>Designação</i>	<i>N</i>	<i>Tipo de Tratamento de Superfície</i>
<b>Grupo A</b>	12	Amostras Zr sem tratamento
<b>Grupo B</b>	12	Amostras Zr jateamento e ataque ácido
<b>Grupo C</b>	12	Amostras Zr D10 P10
<b>Grupo D</b>	12	Amostras Zr D20 P1

Para a texturização por laser foi utilizado um laser Nd:YAG (OEM Plus, Sisma<sup>®</sup>, Vicenza, Itália) com 0,06 W de potência, um feixe de saída com comprimento de onda de 1064  $\mu m$ , diâmetro de 3  $\mu m$ , frequência de 20 kHz, 0.3 mJ/pulso de energia máxima e 128 mm/s de velocidade de digitalização, sob ar atmosférico e a pressão atmosférica normal. As texturas em forma de grelha foram desenhadas num programa de desenho assistido por computador, tal como esquematizado na Figura 1. O desenho e os parâmetros pretendidos para a produção de texturas foram controlados a partir de um programa de computador (Sisma Laser Controller, SLC), sendo realizados nos compactos de Zircónia antes da sua sinterização.



*Figura 1 – Esquema ilustrativo das amostras produzidas e do padrão de laser realizado para a texturização das amostras de Laser: grelha obtida através da passagem de feixes de Laser a distâncias de 10 µm (Grupo C) e 20µm (Grupo D).*

As amostras do Grupo B foram submetidas a jateamento e ataque ácido após sinterização através da projeção de partículas esféricas de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) de 250 µm, a aproximadamente 12 cm de distância e com uma direção perpendicular à superfície (ângulo de impacto de 90°) a pressão constante de 6 bar, durante 30 segundos. Seguidamente foram limpas num banho de álcool isopropílico durante 5 minutos e imersas em ácido fluorídrico (HF 48%) durante 30 minutos à temperatura ambiente, e novamente limpas segundo o mesmo protocolo já referido.

As amostras foram sinterizadas utilizando um forno de elevadas temperaturas (Zirkonofen 700, Zirkonzahn, Italy), a uma temperatura de 1500 °C, uma taxa de arrefecimento/aquecimento de 8 °C/min e 2h de tempo de espera, de acordo com as instruções do fornecedor (Tosoh Corporation, Japan).

Após a sinterização obtiveram-se amostras com 9 mm de diâmetro e 2 mm de altura. Todas as amostras foram limpas em banho ultrassónico de álcool isopropílico durante 10 minutos seguido de água destilada durante o mesmo tempo de forma a eliminar quaisquer resíduos ou contaminação superficial.

Seguidamente, as amostras texturizadas com laser foram avaliadas quanto à sua rugosidade (Ra) através de perfilometria de contacto (Surftest SJ 210, Mitutoyo, Tokyo, Japan, equipado com uma sonda de toque com uma agulha de diamante de 2 µm de e inclinação de 60°) e observadas por Microscopia Eletrónica de Varrimento (Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy , FEG-SEM, JSM-6010 LV, JEOL Ltd., Japão) a ampliações de 120x, 500x e 5000x.

As amostras foram devidamente acondicionadas e enviadas para o Laboratório de Cultura Celular da FMDUL onde foram realizados todos os passos da caracterização biológica.

## **2. Culturas Celulares**

De forma a mimetizar as condições *in vivo*, foi utilizada uma linhagem celular humana primária imortalizada, os Fibroblastos Gengivais Humanos (HGF-hTERT, ABM<sup>®</sup> Canada), numa quarta passagem de cultura (permitindo prever uma manutenção do comportamento destas linhagens celulares). Tratando-se de culturas celulares, toda a manipulação foi realizada de acordo com a técnica asséptica de manipulação recorrendo a câmara de fluxo laminar (Biobase<sup>®</sup>, Jinan, China).

As células, congeladas em azoto na fase líquida num criocervador Arpege 70 (Air Liquide<sup>®</sup>, França), foram descongeladas e semeadas em frascos cultura (VWR<sup>™</sup>, Radnor, Pensilvânia, EUA) de 75cm<sup>3</sup> em meio de cultura composto por uma mistura de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium - Lonza<sup>®</sup>, Suíça), 10% de Soro Bovino Fetal (Biowest<sup>®</sup>, França) e 1% Penicilina com streptomina (G255 Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC, Canada). As células foram seguidamente cultivadas numa incubadora adaptada (Memmert<sup>®</sup>, Schwabach, Alemanha) em condições ambientais controladas: 5% Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>), humidade 98% e uma temperatura de 37°C. O meio da cultura de cada frasco foi trocado após 1 dia de cultura e durante a fase de multiplicação e crescimento a cada 2 dias.

Quando as células atingiram uma confluência aproximada de 80% (aproximadamente 1 semana), procedeu-se ao destacamento enzimático destas células da superfície de crescimento, utilizando Tripsina-EDTA (Lonza<sup>™</sup>, Basileia, Suíça) durante 5-10 minutos até haver destacamento de todas as células no frasco. Determinou-se o número de células viáveis com recurso à coloração de células mortas por Trypan-Blue (AMRESCO<sup>®</sup>, Solon, Ohio, EUA) e a uma câmara Neubauer (Laboroptik Ltd., Reino Unido), num microscópio invertido de contraste de fase (Olympus CK2), permitindo obter a quantidade de células necessárias para cada ensaio, garantindo uma densidade de 1x10<sup>4</sup> células em 500µl de meio de cultura por poço.

As amostras foram previamente identificadas na sua base com o grupo a que pertencem, descontaminadas (banho ultrassônico em etanol 70% durante 30 minutos seguido de novo banho ultrassônico de 30 minutos em água destilada e desionizada) e esterilizadas. Antes de proceder ao destacamento enzimático das células, as amostras foram distribuídas por placas de cultura de 48 poços (Corning Inc<sup>®</sup>, Corning, Nova Iorque, EUA), com um N=4 para cada grupo por ensaio, e incubadas com meio de cultura apropriado à cultura celular durante 1 hora. Após esse tempo, o meio de cultura foi aspirado e foi semeada a densidade referida anteriormente.

### ***2.1 Viabilidade celular e Ensaio de proliferação***

A viabilidade celular e proliferação foram avaliadas para cada amostra em três ensaios separados e nas mesmas condições experimentais já referidas (n=4 amostras de cada grupo por cada ensaio), usando um ensaio de viabilidade baseado na redução de rezasurina em resasorfina, com o reagente Cell-TiterBlue<sup>®</sup> (Promega<sup>®</sup>, Madison, EUA) e de acordo com o protocolo do fabricante.

A taxa de conversão do corante azul não-fluorescente (possível apenas em mitocôndrias de células viáveis) foi determinada como intensidade de fluorescência em unidades de fluorescência arbitrárias (UA) depois de 1, 3 e 7 dias de cultura, em três ensaios distintos de forma a prevenir e identificar discrepâncias na técnica.

A intensidade de fluorescência foi detetada a comprimentos de onda de excitação 530/30nm e emissão de 595/10nm usando um leitor multimodo de microplacas (VICTOR NivoTM HH3500, PerkinElmer<sup>®</sup>, Pontyclun, Reino Unido).

### ***2.2 Quantificação IL-1 $\beta$ por método de ELISA***

A quantidade de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) presente no sobrenadante das culturas celulares dos fibroblastos às 24 e 72 horas de cultura foi medido utilizando o kit Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D Systems Inc, Minneapolis, Minnesota, EUA), segundo as instruções do fabricante.

A densidade ótica (absorvância) dos valores padrão e das amostras foi medida recorrendo a um leitor multimodo de microplacas (VICTOR NivoTM HH3500, PerkinElmer<sup>®</sup>, Pontyclun, UK) aos comprimentos de onda 450nm e 540nm e foram subtraídos os valores obtidos com o comprimento de onda de 540nm aos de 450nm de forma a minimizar imperfeições óticas na leitura da placa.

Os resultados da concentração de IL-1 $\beta$  foram obtidos em pg/mL através da função da regressão linear dos valores de absorvância registrados para a reta de calibração.

### **2.3 Quantificação IL-6 por método de ELISA**

A quantidade de interleucina 6 (IL-6) presente no sobrenadante das culturas celulares dos fibroblastos às 24 e 72 horas de cultura foi medido utilizando o kit Human IL-6 DuoSet ELISA (R&D Systems Inc, Minneapolis, Minnesota, EUA), segundo as instruções do fabricante.

A densidade ótica (absorvância) dos valores padrão e das amostras foi medida recorrendo a um leitor multimodo de microplacas (VICTOR Nivo<sup>TM</sup> HH3500, PerkinElmer<sup>®</sup>, Pontyclun, UK) aos comprimentos de onda 450nm e 540nm e foram subtraídos os valores obtidos com o comprimento de onda de 540nm aos de 450nm de forma a minimizar imperfeições óticas na leitura da placa.

Os resultados da concentração de IL-6 foram obtidos em pg/mL através da função da regressão linear dos valores de absorvância registrados para a reta de calibração.

## **3. Microscopia eletrônica de varrimento (FEG-SEM) e Microscopia de fluorescência**

As amostras cultivadas anteriormente foram descontaminadas, esterilizadas, e novamente semeadas com fibroblastos, cultivados nas mesmas condições anteriormente referidas, sendo que foram fixadas para observação em microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varrimento (FEG-SEM) às 24 horas e 3 dias, 2 amostras de cada grupo e para cada tempo para cada uma das técnicas.

### **3.1 Microscopia de fluorescência**

As amostras foram então lavadas com tampão fosfato-salino – PBS (VWR<sup>TM</sup>, Radnor, Pensilvânia, EUA), fixadas, recorrendo a uma solução de Formaldeído 4% em PBS (PanReac Applichem, ITW Reagents Division, cód. 252931.1214) durante 10 minutos, permeabilizadas com 0,10% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) durante 5 minutos e realizada a coloração dos citoplasmas, recorrendo a Faloidina (Phalloidin FITC Reagent - ab235137) e os núcleo celulares, recorrendo Iodeto de Propídeo (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany, P4864-10ML), ambos segundo instruções dos fabricantes.

Posteriormente, as amostras foram montadas sobre lâminas e observadas no microscópio de fluorescência (Olympus -BX50, filtros: EX/Em = 493/517nm WIB – Faloidina;

EX/Em = 535/617nm WG - Iodeto de Propídeo). Foram ainda obtidas imagens de sobreposição a uma ampliação de 10x utilizando a câmara acoplada ao microscópio (Leica DFC3000 G) e o programa da mesma para computador (LAS X 3.6.0.20104, Leica Microsystems, USA).

Dois investigadores calibrados avaliaram a morfologia celular e distribuição através das imagens obtidas.

### **3.2 Microscopia eletrónica de varrimento (FEG-SEM)**

Após lavagem com tampão fosfato-salino – PBS (VWR™, Radnor, Pensilvânia, EUA), as amostras foram fixadas, recorrendo a uma solução de 2,5% (v/v) Glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Inglaterra) durante 1 hora e desidratadas utilizando soluções aquosas de etanol (LaborSpirit Lda, Loures, Portugal) de concentração crescente (20% a 100% (v/v), com intervalos de 10%), durante 30 min para cada uma e deixadas secar totalmente após aspiração do último álcool na câmara de fluxo laminar ligada. As amostras foram seladas dentro da placa em que se encontravam e armazenadas a 4°C até serem enviadas para a visualização em FEG-SEM.

No dia da observação, as amostras foram cobertas por um filme ultrafino (15 nm) de Ouro-Paládio (Au-Pd) com 80-20% (massa), utilizando um aplicador de pulverização catódica de elevada resolução (208HR Cressington Company, Watford, Reino Unido), acoplado a um controlador de espessura de elevada resolução (MTM-20 Cressington). As amostras foram observadas sob (FEG-SEM) com uma voltagem de aceleração de 10kV com várias ampliações.

Dois investigadores calibrados avaliaram a morfologia celular, distribuição e estabelecimento de contacto precoce com os materiais através das imagens obtidas.

## **4. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada usando os programas: Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO versão 2009 (Microsoft®, Washington, EUA), IBM SPSS Statistics 26.0 para Windows (SPSS, Chicago, EUA) e GraphPad Prism 8 para Windows (GraphPad Software, Inc. San Diego CA, EUA).

A confirmação da distribuição normal das amostras foi realizada para os vários grupos através dos testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. A comparação entre grupos para viabilidade celular, IL-6 e IL-1β foi realizada com base na análise da variância em 1 sentido (*One-way ANOVA*) e a análise da variância em 2 sentidos de medidas repetidas com

recorrência (Two-way repeated measures ANOVA), com recurso a testes *post-hoc* de Tukey's para identificar diferenças estatisticamente significativas entre grupos. O nível de significância foi definido como  $p < 0.05$  e todos os resultados foram apresentados como uma média  $\pm$  desvio padrão (DP).

#### ***4.1 Cálculo da dimensão amostral e poder estatístico***

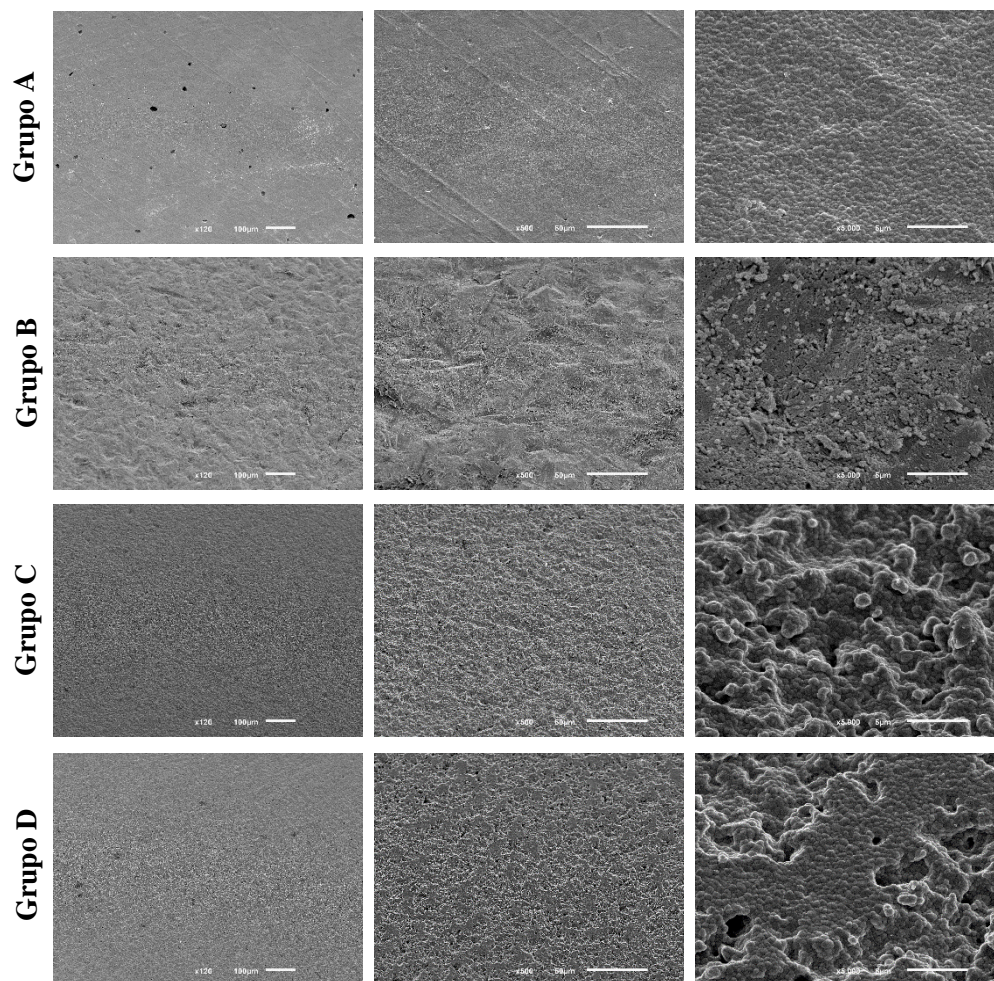
A dimensão da amostra foi estimada para cada um dos grupos com base numa taxa de erro tipo I ( $\alpha$ ) de 0.05 e de poder estatístico de 0.80 ( $\beta$ ).

Foi determinado através de um simulador para cálculo do poder estatístico (G\*Power 3.1.9.7 para Windows, Dusseldorf, Alemanha) e acordo com resultados preliminares obtidos em estudos semelhantes <sup>(52)</sup> do foi determinado um N=12 para cada grupo como necessário para detetar uma dimensão de efeito de 1,4 tendo em conta o poder estatístico definido (0,80).

## RESULTADOS

### 1. Propriedades Físicas das Superfícies

O aspeto final das amostras de cada grupo foi observado através de FEG-SEM após a texturização e sinterização, permitindo a observação das superfícies. É observável em todas as amostras a presença de textura à nanoescala, no entanto o seu aspeto varia consideravelmente consoante o tipo de tratamento utilizado. No Grupo A, é visível a formação de uma superfície homogénea, com os grãos de Zircónia (com dimensões à nanoescala) expostos e identificáveis. No Grupo B a superfície é muito mais irregular, sendo visível a degradação que houve dos grãos de Zircónia superficiais. No Grupo C observa-se a presença de uma superfície irregular, com picos e vales pouco definidos, e observa-se que há manutenção dos grânulos de Zircónia visíveis. No Grupo D, à semelhança do C, mantêm-se os grânulos de Zircónia visíveis, sendo a superfície formada irregular, mas com zonas que mantiveram a aparência homogénea semelhante à presente no Grupo A, intercaladas com zonas de depressão.



*Figura 2 - Imagens de FEG-SEM das superfícies das amostras dos vários grupos após o tratamento da superfície e sinterização com uma ampliação de 120x, 500x e 1000x.*

Os valores de rugosidade – Ra ( $\mu\text{m}$ ) foram medidos por perfilometria de contacto para as amostras de preparação com Laser (Grupos C e D, N=2 por grupo) e apresentados como uma média e um desvio padrão (DP), tal como apresentado na tabela 2. Os valores de rugosidade para os Grupos A e B foram anteriormente obtidos e publicados num estudo realizado pelos colaboradores da UMinho que produziram as amostras utilizadas no presente estudo.<sup>(40)</sup>

Foram obtidos para os Grupos C e D valores de  $R_a$  correspondentes a uma rugosidade intermédia de acordo com a classificação de Wenneberg et.al.<sup>(24)</sup>

*Tabela 3 - Valores de rugosidade-Ra ( $\mu\text{m}$ ) das superfícies das amostras de cada grupo, apresentados como média e desvio padrão. Valores dos Grupos A e B retirados de Faria et al.<sup>(40)</sup> Sendo D a distância em  $\mu\text{m}$  entre as linhas de grelha e P o número de passagens*

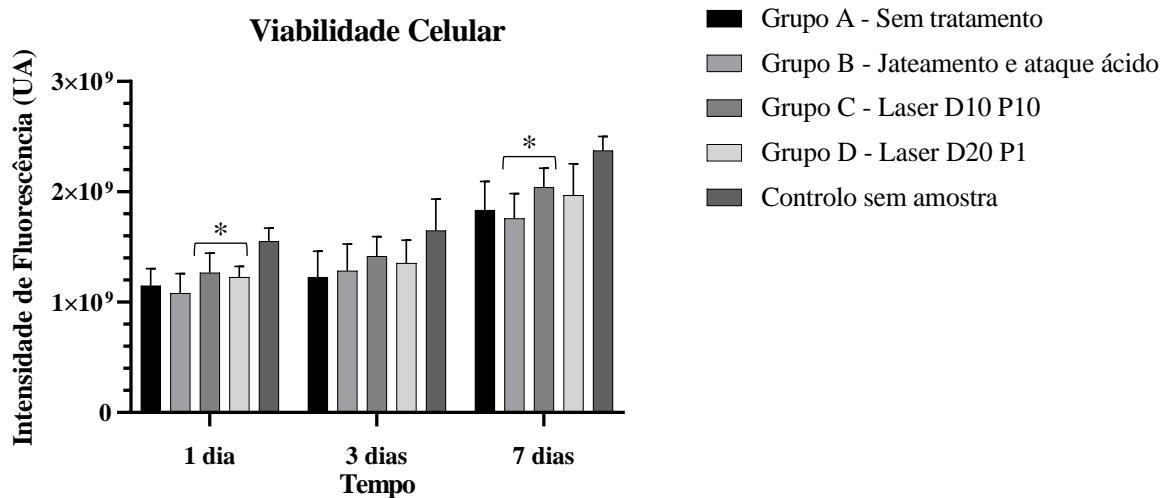
<b>DESIGNAÇÃO (GRUPO)</b>	<b>MÉDIA DA <math>R_a</math> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>DESVIO PADRÃO (DP)</b>
<b>Grupo A<sup>(40)</sup></b> <i>Sem tratamento</i>	0.14	0.03
<b>Grupo B<sup>(40)</sup></b> <i>Jateamento e ataque ácido</i>	2.01	0.07
<b>Grupo C</b> <i>Laser D10P10</i>	1.539	0.143
<b>Grupo D</b> <i>Laser D20P1</i>	1.609	0.158

## 2. Culturas e Comportamento Celular

### 2.1 Viabilidade

De acordo com os resultados obtidos para a viabilidade celular nos 3 ensaios, observou-se um aumento da viabilidade ao longo do tempo para todos os grupos. Apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as médias do Grupo C (laser D10 P10) e o Grupo B (jateamento e ataque ácido) aos 1 e 7 dias de cultura de acordo com o *one-way ANOVA* com teste post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ). Aos 3 dias de cultura não existiram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo ( $p > 0,05$ ).

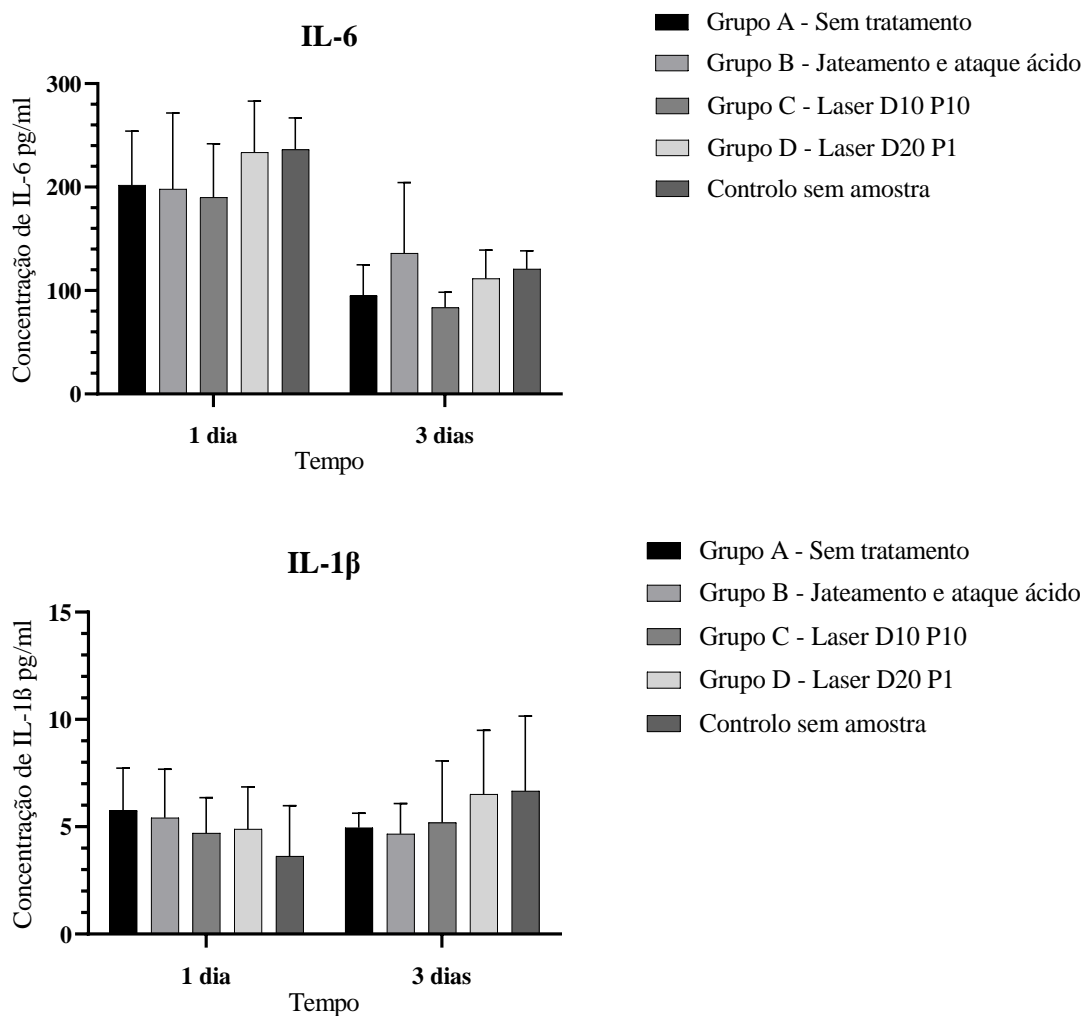
Ao realizar o teste *two-way ANOVA* de medidas repetidas com teste post-hoc de Tukey verificou-se que o Grupo C, apresenta uma progressão da viabilidade\*tempo significativamente superior aos Grupos A e B ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 1** - Resultados de viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos Grupos A (Sem tratamento), B (Jateamento e ataque ácido), C (laser D10 P10), D (laser D20 P1) e controlo positivo (incluído meramente para validação das condições experimentais) aos 1, 3 e 7 dias de cultura ( $n=12$ ). As barras de erro representam o desvio padrão e um *one-way ANOVA* com teste post-hoc de Tukey foi utilizado para a comparação entre grupos. Significância estatística apresentada:  $*P < 0,05$ .

## 2.2 Interleucina 1 $\beta$ e Interleucina 6

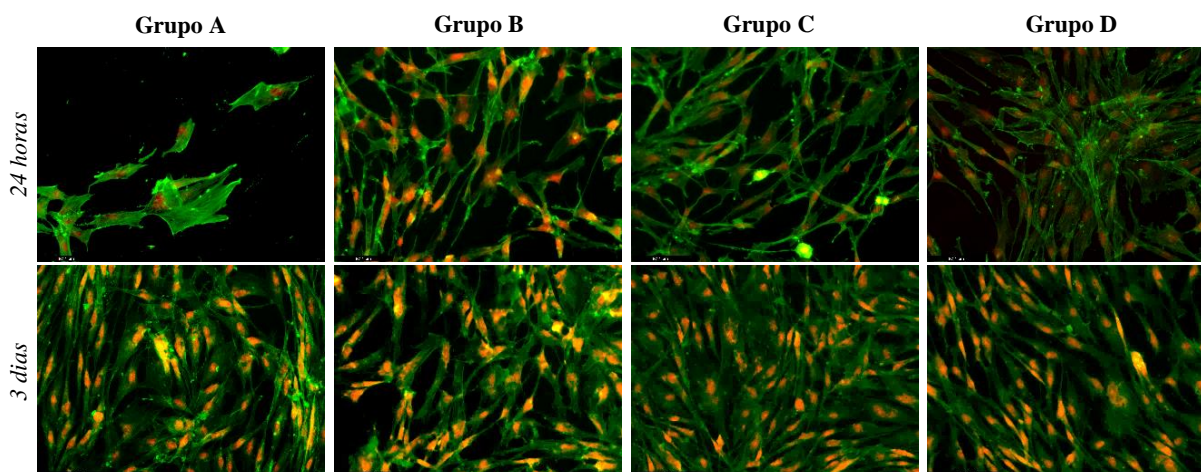
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre grupos em nenhuma das interleucinas para nenhum dos tempos ( $p > 0,05$ ). A IL-6 apresentou uma redução dos valores de concentração ao longo do tempo para todos os grupos ( $p < 0,05$ ). A IL-1 $\beta$  apresentou valores de concentração muito baixos para todos os grupos, em todos os tempos, e sem diferenças estatisticamente significativas nas variações das concentrações ao longo do tempo ( $p > 0,05$ ).



**Gráfico 2 e 3-** Média obtida da concentração de Interleucina 6 e 1 $\beta$ , em pg/mL, na cultura de fibroblastos em todos dos Grupos A (Sem tratamento), B (Jateamento e ataque ácido), C (laser D10 P10), D (laser D20 P1) e controlo positivo (incluído meramente para validação das condições experimentais) aos 1, 3 e 7 dias de cultura ( $n=12$ ). As barras de erro representam o desvio padrão e um one-way ANOVA com teste post-hoc de Tukey foi utilizado para a comparação entre grupos. Significância estatística apresentada: \* $P < 0,05$ .

### 2.3 Morfologia Celular – Fluorescência

As imagens obtidas através de fluorescência (Figura 4) demonstram a presença de células aderidas em todas as amostras. Observa-se a presença de prolongamentos do corpo celular para a superfície da amostra em todos os grupos e a presença de maior número aparente de células nas amostras dos Grupos C e D (tratadas com laser).



**Figura 3** – Imagens de microscopia de fluorescência, obtidas de amostras fixadas às 24 horas e 3 dias para cada um dos grupos. Coloração dos citoplasmas, recorrendo a Faloidina ( filtro EX/Em = 493/517nm WIB) e os núcleo celulares, recorrendo Iodeto de Propídeo (EX/Em = 535/617nm WG). Ampliação 400x.

### 2.4 Morfologia Celular (SEM)

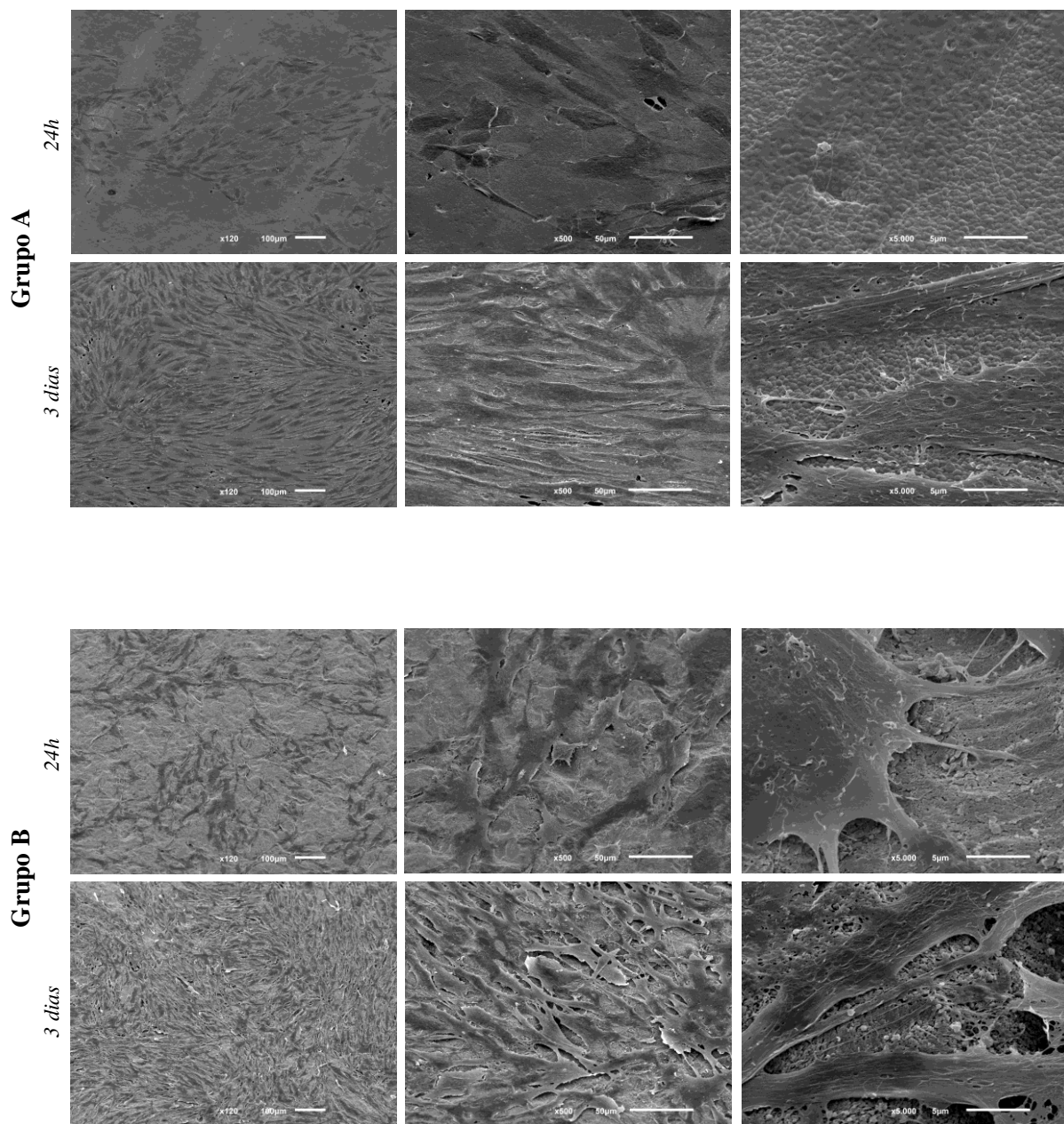
Foram obtidas as imagens de FEG-SEM das amostras dos fibroblastos após 24 horas e 3 dias de cultura (Figura 5) com diferentes ampliações. Observa-se a presença de células aderidas em todos os grupos após 1 e 3 dias de cultura.

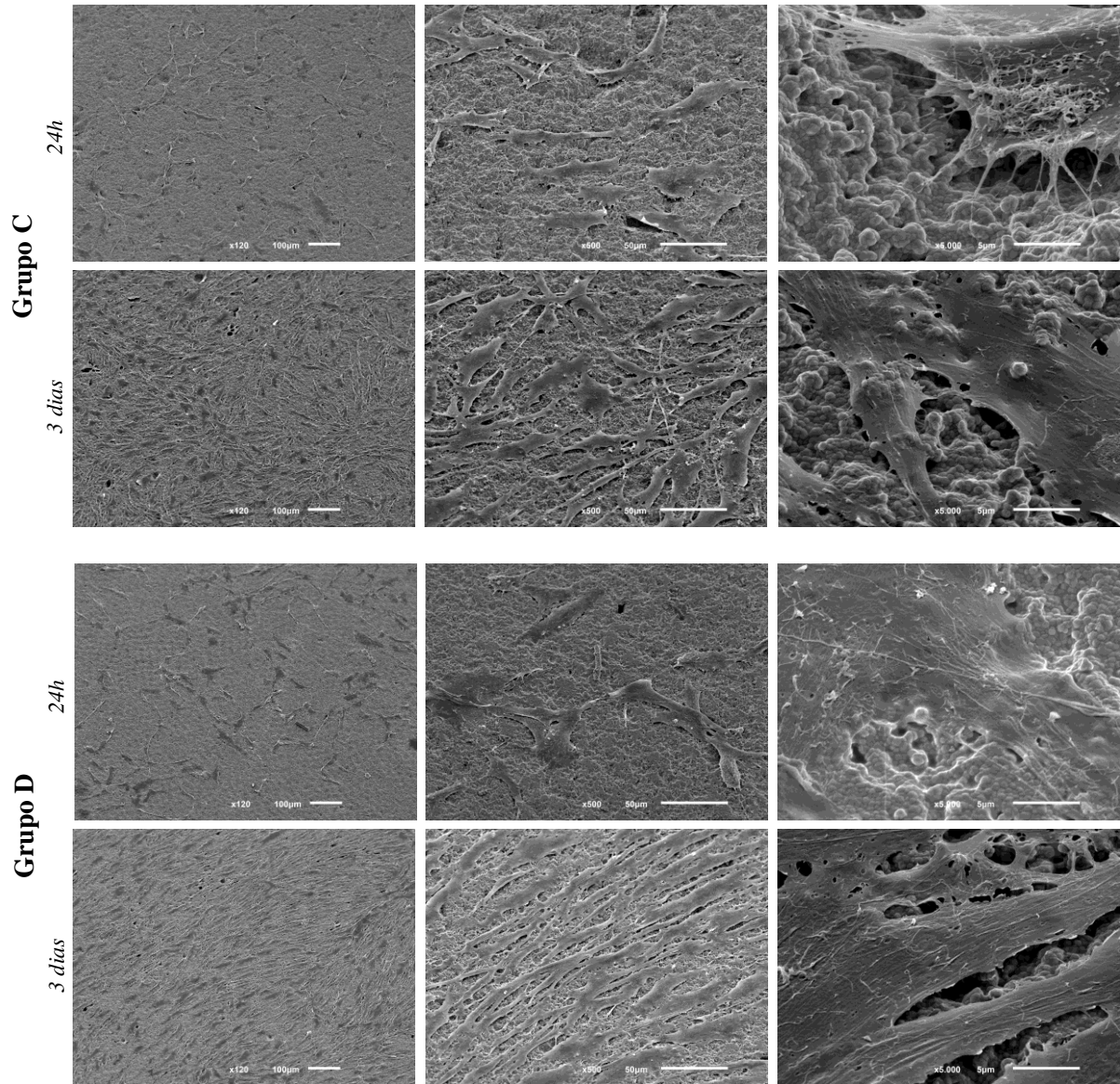
Os corpos celulares apresentam uma morfologia com um fenótipo típico de fibroblastos em todos os grupos e não existe sobreposição de camadas de células. As células cultivadas por 3 dias apresentam-se em quantidades visivelmente superiores e encontram-se mais espalhadas e alongadas do que as de 1 dia para todos os grupos, o que é compatível com os dados da viabilidade apresentados.

As células do Grupo A, apresentam-se com uma morfologia achatada, esticada e com numerosas extensões celulares, encontrando-se visivelmente mais próximas da superfície do que as células das outras amostras. No Grupo B existe uma menor quantidade de células aderidas em ambos os tempos, quando comparadas com as dos outros grupos e os fibroblastos presentes, aparentam estar elevados em relação à superfície, evidenciando uma menor adesão. Nas amostras do Grupo C, observa-se que a adesão dos prolongamentos celulares tipo filipódias

ocorre entre os nódulos de Zircónia, não havendo adesão às zonas de depressões. Nas amostras do Grupo D observa-se as células bem esticadas e aderidas de forma alinhada sobre a superfície.

Foi ainda possível observar que os prolongamentos celulares aderem a texturas à nanoescala.





**Figura 4 -** *Imagens de SEM com fibroblastos cultivados nas superfícies das amostras de todos os grupos em estudo ao 1 dia e 3 dias de cultura com ampliação de 120x, 500x e 5000x.*

## DISCUSSÃO

Esta dissertação teve como objetivo avaliar o comportamento de fibroblastos em superfícies de Y-TZP texturizadas por laser Nd:YAG com padrão semelhante ao obtido através de jateamento e ataque ácido, e compará-lo com o obtido em superfícies tratadas com jateamento e ataque ácido segundo o método convencional.

A Zircônia tem vindo a ser utilizada de forma crescente para o fabrico de pilares implantares dadas as suas vantagens, tais como elevadas características estéticas, menor desenvolvimento de biofilme e bons resultados do comportamento celular, tanto em fibroblastos como em osteoblastos, apresentando inclusivamente melhores resultados do que o Titânio em vários estudos. <sup>(22,27,33,53)</sup> Razões pelas quais tem vindo a ser cada vez mais considerada uma opção viável para o fabrico dos componentes de implantes.

A modificação da superfície dos materiais do pilar parece influenciar a relação entre o pilar do implante e os tecidos moles, como tal têm vindo a ser realizados vários estudos de forma a avaliar várias metodologias de preparação de superfícies que permitam otimizar a qualidade do selamento do tecido conjuntivo em torno do implante. <sup>(11,22)</sup>

A técnica de jateamento e ataque ácido é considerada atualmente o *gold standard* para a texturização de implantes dentários pelas suas ótimas características para a osteointegração. <sup>(40)</sup> Para as células dos tecidos moles, este tipo de preparação de superfície apresenta resultados menos favoráveis na literatura <sup>(22)</sup>, no entanto a possibilidade de identificar uma técnica de tratamento de superfície que seja simultaneamente favorável para as células dos tecidos moles e duros simplificaria o fabrico de implantes e potencialmente diminuiria a ocorrência de erros neste processo.

Através da texturização por laser com diferentes parâmetros originaram-se superfícies com características diferentes, mas todas com uma rugosidade intermédia, com topografia à micro e nanoescala visível nas imagens de FEG-SEM e manutenção dos cristais de Zircônia íntegros e com uma morfologia globular nanométrica característica. Nas superfícies obtidas por jateamento e ataque ácido, deixou de ser possível observar este tipo de estruturas, apresentando ao invés uma textura irregular e acidentada. Todas as amostras foram produzidas recorrendo a uma técnica de produção e técnicas de texturização protocoladas e validadas anteriormente e avaliadas quanto às suas características físicas. <sup>(40)</sup>

Segundo a literatura disponível atualmente, as superfícies ideais para a adesão de fibroblastos têm uma rugosidade compreendida entre 0,08 e 1  $\mu\text{m}$  <sup>(39)</sup>, pelo que de acordo com os resultados de  $R_a$  obtidos, apenas as amostras do Grupo A parecem dentro do intervalo considerado ideal, sendo que as restantes amostras apresentam um valor superior ao mesmo.

A avaliação do comportamento celular foi realizada de acordo com técnicas e protocolos previamente estudados e validados. <sup>(42,52-54)</sup> Quanto à viabilidade celular, observaram-se valores inferiores para as amostras tratadas com jateamento e ataque ácido (Grupo B) em todos os tempos, no entanto estes resultados apenas foram estatisticamente significativos quando comparados com os do Grupo C, correspondente ao tratamento com Laser com uma distância entre linhas do padrão em grelha de 10 $\mu\text{m}$  e 10 passagens, às 24 horas e aos 7 dias.

O resultado menos favorável de superfícies tratadas com jateamento e ataque ácido (Grupo B) na viabilidade de fibroblastos apresentado neste estudo confirma os resultados obtidos noutros estudos já publicados. <sup>(22)</sup> Num estudo realizado por Cho et al. <sup>(55)</sup> onde se comparou a resposta de fibroblastos em superfícies lisas (polidas) e rugosas (jateadas), observou-se um pior comportamento celular dos fibroblastos nas superfícies tratadas através de jateamento. Noutro estudo <sup>(13)</sup>, superfícies de Ti-Zr maquinadas tratadas com ataque ácido também parecem apresentar resultados negativos na viabilidade e proliferação de fibroblastos.

A rugosidade descrita como a “ideal” <sup>(39)</sup> para a adesão e proliferação dos fibroblastos nas amostras do Grupo A (sem tratamento) não se traduziu em melhores resultados de viabilidade celular face ao tratamento com laser do Grupo C neste estudo. No entanto este resultado favorável obtido para o tratamento de superfícies por laser tem vindo a ser comprovado por outros estudos na literatura. <sup>(22)</sup> Num outro estudo *in vitro* realizado por Esfahanizadeh et al. <sup>(49)</sup>, observaram-se melhores resultados para superfícies tratadas por Laser-Lok (com uma rugosidade de 1,33 $\mu\text{m}$ ) quando comparados com discos de Zircónia sem este tratamento, sendo esta melhoria justificada pela presença de microestruturas de superfície com uma nano-morfologia repetitiva que permite maximizar a área de contacto das células e das microfibrilhas de colagénio, relação referida também noutros estudos. <sup>(56,57)</sup> Este comportamento pode ainda ser devido à manutenção dessa mesma topografia à nanoescala que a superfície das amostras do Grupo C pareceu proporcionar melhores resultados de viabilidade no presente estudo. Assim, os resultados obtidos sugerem que as condições de superfície criadas pelo laser parecem ser mais relevantes do que a rugosidade no comportamento celular de fibroblastos.

Quanto às interleucinas, tanto a IL-6 como a IL-1 $\beta$  são interleucinas inflamatórias com um papel importante durante o processo da cicatrização <sup>(58,59)</sup>, sendo que a IL-6 promove a diferenciação de linfócitos B, o crescimento de linfócitos T, inibe o crescimento de fibroblastos e melhora a expressão de antigénio MHC classe I, encontrando-se associada na literatura aos eventos moleculares associados à doença periodontal <sup>(60)</sup>; a IL-1 $\beta$  é um potente estimulante de reabsorção óssea, induz a produção de IL-6 e está associada, quando em quantidades moderadas, a uma proliferação de fibroblastos favorecedora da cicatrização. <sup>(58,60)</sup>

Não foram observadas, diferenças estatisticamente significativas na secreção destas citocinas pelos fibroblastos no presente estudo. No caso da IL-6, foi observada de forma algo homogénea a sua diminuição ao longo do tempo. Num estudo realizado por Gómez-Florit et al <sup>(13)</sup> a produção mantida de IL-6 é sugestiva de uma ausência de uma situação pró-inflamatória, como tal e tendo em conta a função desta interleucina, é possível especular que o contacto dos fibroblastos gengivais com as superfícies de Zircónia estudadas no presente estudo promove uma redução da resposta inflamatória ao longo do tempo, independentemente do tratamento de superfície utilizado. <sup>(59,60)</sup> No caso da IL-1 $\beta$  os valores registados foram muito baixos para ambos os tempos. Como tal é expectável a ocorrência dos efeitos reconhecidos para esta interleucina <sup>(58,60)</sup>, no entanto pela sua concentração ser reduzida, é expectável que estes ocorram de forma controlada e favorável à cicatrização. Os resultados deste estudo permitem então concluir que não parece haver uma produção significativamente superior de interleucinas inflamatórias para nenhum dos tratamentos de superfície testados, sendo os seus valores e a sua evolução ao longo do tempo sugestivos de uma ausência de situação pró-inflamatória.

Na observação em FEG-SEM e microscopia de fluorescência, as amostras dos Grupos C e D apresentam um número de células aparentemente superior às presentes nos restantes grupos, correspondendo aproximadamente às proporções observadas nos resultados de viabilidade celular obtidos. Nas imagens de FEG-SEM observou-se que as amostras do Grupo B apresentavam-se pouco aderidas à superfície. Na microscopia de fluorescência, foi observado um descolamento de células da superfície em todas as amostras após a sua fixação e coloração, no entanto esta ocorrência foi mais significativa nas amostras do Grupo B. Estas observações sugerem que as células formam uma adesão menos forte à superfície das amostras tratadas com jateamento e ataque ácido. No estudo de Esfahanizadeh et al. <sup>(49)</sup> a texturização por laser demonstrou uma superior expressão de integrina, proteína responsável pela adesão, o que pode justificar a boa adesão observável nos grupos texturizados por laser.

Para responder aos objetivos propostos, foram definidos os grupos em estudo previamente. No entanto, devido a dificuldades no fabrico, não foi possível incluir todos os grupos de controlo planeados, nomeadamente: Titânio sem tratamento, Titânio maquinado (material mais utilizado e estudado para o fabrico de pilares de implantes) <sup>(22)</sup> e a Zircónia maquinada. Esta constitui uma limitação considerável do estudo, visto que limita a possibilidade de comparações com outros estudos. Outra limitação foi o facto de não ter sido feita uma avaliação da molhabilidade das amostras, fator referido como importante para o comportamento e adesão celular.<sup>(11,31)</sup> Além disso, apesar de ser visível nas imagens de FEG-SEM, não foi possível detetar empiricamente a nanotopografia presente nas amostras de laser. Isto deveu-se ao facto da ponta utilizada no perfilómetro de contacto utilizado ter 2 µm, não possuindo sensibilidade suficiente. A quantificação desta nano-rugosidade seria importante de forma a definir melhor o seu efeito e influência no comportamento celular.

Dado ao número reduzido de amostras fabricadas, a observação em FEG-SEM e microscopia de fluorescência foi realizada em amostras já utilizadas nos ensaios de viabilidade (após desproteinização, descontaminação e esterilização). Isto poderá ter influenciado as imagens obtidas devido à potencial contaminação das amostras com remanescentes de matriz orgânica produzidas no ensaio anterior. Seria ideal a produção de mais amostras de forma a permitir a utilização de amostras com o mesmo ponto de partida em todos os casos.

Estudos futuros deverão procurar verificar outros fatores relevantes para a avaliação dos tecidos moles como a produção de colagénio tipo I e expressão de proteínas relacionadas com a adesão, avaliar a proliferação de células epiteliais nestas superfícies e estudos microbiológicos, idealmente até em modelos de cultura tridimensionais, que permitam analisar a interação entre todos os fatores envolvidos na integração dos tecidos moles e aproximar do comportamento *in vivo* <sup>(61)</sup>, permitindo validar este tipo de tratamento de superfície na Zircónia.

Além da realização destes estudos *in vitro* é, sem dúvida também importante a realização de estudos *in vivo*, em sistemas biológicos mais complexos, de forma a comprovar a existência de uma vantagem deste tipo de superfície e validar a sua aplicação clínica.

Apesar das suas limitações, este estudo vem a reforçar a existência de um futuro promissor para a texturização de superfícies com laser. Além das suas capacidades biológicas já reconhecidas na texturização de superfícies através de um método subtrativo, o laser é uma tecnologia em desenvolvimento e com um elevado potencial para criação de múltiplos padrões com múltiplas características e até para criação de outros tipos de superfícies com características

interessantes, como a funcionalização de superfícies através de métodos aditivos que permite, por exemplo, juntar às suas características biológicas favoráveis, características anti-inflamatórias e/ou antibacterianas. <sup>(62-64)</sup> Como tal, os resultados deste trabalho substanciam o interesse da realização de estudos subsequentes da aplicação da técnica de laser Nd:YAG para a otimização de superfícies baseadas em zircónia nas suas múltiplas potencialidades, nomeadamente o desenvolvimento de padrões, texturas e técnicas através de métodos subtrativos, como o aqui utilizado, ou até aditivos, com o objetivo de maximizar a resposta dos tecidos moles.

## CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, foi possível concluir que as superfícies implantares de Zircónia texturizadas por laser Nd:YAG, resultando em textura semelhante à obtida no jateamento e ataque ácido, parecem beneficiar o comportamento de fibroblastos comparativamente a superfícies tratadas com jateamento e ataque ácido.

A texturização por laser com padrão em grelha, o que resulta numa padronização semelhante ao jateamento e ataque ácido, parece então ser um tratamento promissor para a superfície de pilares de Zircónia, sendo importante continuar a testar este e outros padrões e métodos de texturização por laser recorrendo a mais estudos *in vitro* e *in vivo* de forma a confirmar a existência de vantagens biológicas na utilização desta técnica além das que já são conhecidas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Esposito M, Ardebili Y, Worthington H V. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Jul 22;(7):CD003815.
2. Brånemark R, Brånemark PI, Rydevik B, Myers RR. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *J Rehabil Res Dev*. 2001 Mar-Apr;38(2):175-81.
3. Saini M. Implant biomaterials: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Cases*. *World J Clin Cases*. 2015 Jan 16;3(1):52-7.
4. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2009 Apr-Jun;9(2):61-71.
5. Albrektsson T, Wennerberg A. On osseointegration in relation to implant surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019 Mar;21 Suppl 1:4-7.
6. Albrektsson T, Brånemark P-I, Hansson H-A, Lindström J. Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52(2):155-70.
7. Pellegrini G, Francetti L, Barbaro B, del Fabbro M. Novel surfaces and osseointegration in implant dentistry. *J Investig Clin Dent*. 2018 Nov;9(4):e12349.
8. Araujo MG, Lindhe J. Peri-implant health. *Journal of Clinical Periodontology*. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S230-S236.
9. Rahmitasari F, Ishida Y, Kurahashi K, Matsuda T, Watanabe M, Ichikawa T. PEEK with Reinforced Materials and Modifications for Dental Implant Applications. *Dent J (Basel)*. 2017 Dec 15;5(4):35.
10. Chehroudi B, Gould TRL, Brunette DM. The role of connective tissue in inhibiting epithelial downgrowth on titanium-coated percutaneous implants. *J Biomed Mater Res*. 1992 Apr;26(4):493-515.
11. Rompen E, Domken O, Degidi M, Farias Pontes AE, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Oct;17 Suppl 2:55-67.
12. de Souza VZ, Manfro R, Joly JC, Elias CN, Peruzzo DC, Napimoga MH, et al. Viability and collagen secretion by fibroblasts on titanium surfaces with different acid-etching protocols.

Int J Implant Dent. 2019 Nov 21;5(1):41.

13. Gómez-Florit M, Ramis JM, Xing R, Taxt-Lamolle S, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, et al. Differential response of human gingival fibroblasts to titanium- and titanium-zirconium-modified surfaces. *J Periodontal Res.* 2014 Aug;49(4):425-36.
14. Altmann B, Rabel K, Kohal RJ, Proksch S, Tomakidi P, Adolfsson E, et al. Cellular transcriptional response to zirconia-based implant materials. *Dent Mater.* 2017 Feb;33(2):241-255.
15. Sanz-Martín I, Sanz-Sánchez I, Carrillo de Albornoz A, Figuero E, Sanz M. Effects of modified abutment characteristics on peri-implant soft tissue health: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Jan;29(1):118-129.
16. Atsuta I, Ayukawa Y, Kondo R, Oshiro W, Matsuura Y, Furuhashi A, et al. Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. *J Prosthodont Res.* 2016 Jan;60(1):3-11.
17. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thornsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res.* 1991 Apr-Jun;2(2):81-90.
18. Zhu Y, Zhang C nan, Gu Y xin, Shi J yu, Mo J ji, Qian S jiao, et al. The responses of human gingival fibroblasts to magnesium-doped titanium. *J Biomed Mater Res A.* 2020 Feb;108(2):267-278.
19. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE. Peri-implant mucositis. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S257-S266.
20. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2018 Jun;45 Suppl 20:S246-S266.
21. Blázquez-Hinarejos M, Ayuso-Montero R, Jané-Salas E, López-López J. Influence of surface modified dental implant abutments on connective tissue attachment: A systematic review. *Arch Oral Biol.* 2017 Aug;80:185-192.
22. Corvino E, Pesce P, Mura R, Marcano E, Canullo L. Influence of Modified Titanium Abutment Surface on Peri-implant Soft Tissue Behavior: A Systematic Review of In Vitro Studies. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2020 May/Jun;35(3):503-519.
23. Lee WT, Koak JY, Lim YJ, Kim SK, Kwon HB, Kim MJ. Stress shielding and fatigue

limits of poly-ether-ether-ketone dental implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012 May;100(4):1044-52.

24. Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 Sep-Oct;15(5):675-90.

25. Damiani L, Eales MG, Nobbs AH, Su B, Tsimbouri PM, Salmeron-Sanchez M, et al. Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants. *J Tissue Eng.* 2018 Aug 2;9:2041731418790694.

26. Schalock PC, Menné T, Johansen JD, Taylor JS, Maibach HI, Lidén C, et al. Hypersensitivity reactions to metallic implants - Diagnostic algorithm and suggested patch test series for clinical use. *Contact Dermatitis.* 2012 Jan;66(1):4-19.

27. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Abboud M, Ramirez-Fernandez MP, Mate-Sanchez JE, Negri B, et al. Histologic and histomorphometric behavior of microgrooved zirconia dental implants with immediate loading. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014 Dec;16(6):856-72.

28. Roehling S, Schlegel KA, Woelfler H, Gahlert M. Performance and outcome of zirconia dental implants in clinical studies: A meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Oct;29 Suppl 16:135-153.

29. Bollen C. Zirconia: The Material of Choice in Implant Dentistry? An Update. *Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy.* *J Dent Health Oral Disord Ther.* Mar 2017;6(6):172-175.

30. Roehling S, Astasov-Frauenhoffer M, Hauser-Gerspach I, Braissant O, Woelfler H, Waltimo T, et al. In Vitro Biofilm Formation on Titanium and Zirconia Implant Surfaces. *J Periodontol.* 2017 Mar;88(3):298-307.

31. Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorf J, Scheideler L, Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dent Mater.* 2018 Jan;34(1):40-57.

32. Canullo L, Annunziata M, Pesce P, Tommasato G, Natri L, Guida L. Influence of abutment material and modifications on peri-implant soft-tissue attachment: A systematic review and meta-analysis of histological animal studies. *J Prosthet Dent.* 2020 Mar 17:S0022-3913(20)30093-7.

33. Nothdurft FP, Fontana D, Ruppenthal S, May A, Aktas C, Mehraein Y, et al. Differential Behavior of Fibroblasts and Epithelial Cells on Structured Implant Abutment Materials: A Comparison of Materials and Surface Topographies. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015 Dec;17(6):1237-49.
34. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Sep;20 Suppl 4:172-84.
35. Stanford CM. Surface modifications of dental implants. *Aust Dent J*. 2008 Jun;53 Suppl 1:S26-33.
36. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res*. 1998 Feb;9(1):11-9.
37. 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.
38. Kearns VR, Williams RL, Mirvakily F, Doherty PJ, Martin N. Guided gingival fibroblast attachment to titanium surfaces: An in vitro study. *J Clin Periodontol*. 2013 Jan;40(1):99-108.
39. Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mater. Sci. Eng. C*. 2003;23(4):551–60.
40. Faria D, Madeira S, Buciumeanu M, Silva FS, Carvalho O. Novel laser textured surface designs for improved zirconia implants performance. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020 Mar;108:110390.
41. Coathup MJ, Blunn GW, Mirhosseini N, Erskine K, Liu Z, Garrod DR, et al. Controlled laser texturing of titanium results in reliable osteointegration. *J Orthop Res*. 2017 Apr;35(4):820-828.
42. Fernandes BF, da Cruz MB, Marques JF, Madeira S, Carvalho Ó, Silva FS, et al. Laser Nd:YAG patterning enhance human osteoblast behavior on zirconia implants. *Lasers Med Sci*. 2020 Jun 18.
43. Carvalho A, Canguero L, Oliveira V, Vilar R, Fernandes MH, Monteiro FJ. Femtosecond laser microstructured Alumina toughened Zirconia: A new strategy to improve

osteogenic differentiation of hMSCs. *Appl. Surf. Sci.* 2018 Mar;435:1237–1245.

44. Samant AN, Dahotre NB. Laser machining of structural ceramics-A review. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2009;29(6):969–993.

45. Faria D, Abreu CS, Buciumeanu M, Dourado N, Carvalho O, Silva FS, et al. Ti6Al4V laser surface preparation and functionalization using hydroxyapatite for biomedical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018 May;106(4):1534-1545.

46. Delgado-Ruíz RA, Gomez Moreno G, Aguilar-Salvatierra A, Markovic A, Mate-Sánchez JE, Calvo-Guirado JL. Human fetal osteoblast behavior on zirconia dental implants and zirconia disks with microstructured surfaces. An experimental in vitro study. *Clin Oral Implants Res.* 2016 Nov;27(11):e144-e153.

47. Henriques B, Fabris D, Souza JCM, Silva FS, Carvalho Ó, Fredel MC, et al. Bond strength enhancement of zirconia-porcelain interfaces via Nd:YAG laser surface structuring. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018 May;81:161-167.

48. Cionca N, Hashim D, Mombelli A. Zirconia dental implants: where are we now, and where are we heading? *Periodontol.* 2000. 2017;73(1):241–58.

49. Esfahanizadeh N, Motalebi S, Daneshparvar N, Akhoundi N, Bonakdar S. Morphology, proliferation, and gene expression of gingival fibroblasts on Laser-Lok, titanium, and zirconia surfaces. *Lasers Med Sci.* 2016 Jul;31(5):863-73.

50. Al Rezk F, Trimpou G, Lauer H-C, Weigl P, Krockow N. Response of soft tissue to different abutment materials with different surface topographies: a review of the literature. *Gen Dent.* 2018 Jan-Feb;66(1):18-25.

51. Illeperuma RP, Kim J, Park YJ, Kim JM, Bae JY, Che ZM, et al. Immortalized gingival fibroblasts as a cytotoxicity test model for dental materials. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(3):753–62.

52. Peñarrieta-Juanito GM, Costa M, Cruz M, Miranda G, Henriques B, Marques J, et al. Bioactivity of novel functionally structured titanium-ceramic composites in contact with human osteoblasts. *J Biomed Mater Res A.* 2018 Jul;106(7):1923-1931.

53. da Cruz M, Marques J, Peñarrieta-Juanito G, Costa M, Souza J, Magini R, et al. Hard and Soft Tissue Cell Behavior on Polyetheretherketone, Zirconia, and Titanium Implant Materials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019 January/February;34(1):39–46.

54. da Cruz MB, Marques JF, Fernandes BF, Costa M, Miranda G, da Mata ADSP, et al. Gingival fibroblasts behavior on bioactive zirconia and titanium dental implant surfaces produced by a functionally graded technique. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20200100.
55. Cho YD, Shin JC, Yoon HI, Ku Y, Ryoo HM, Kim DJ, et al. Characterization of human gingival fibroblasts on zirconia surfaces containing niobium oxide. *Materials.* 2015 Sep 10;8(9):6018-6028.
56. Ketabi M, Deporter D. The Effects of Laser Microgrooves on Hard and Soft Tissue Attachment to Implant Collar Surfaces: A Literature Review and Interpretation. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2013 Nov-Dec;33(6):e145-52.
57. Wang X, Lu T, Wen J, Xu L, Zeng D, Wu Q, et al. Selective responses of human gingival fibroblasts and bacteria on carbon fiber reinforced polyetheretherketone with multilevel nanostructured TiO<sub>2</sub>. *Biomaterials.* 2016 Mar;83:207-18.
58. Agarwal S, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, et al. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 $\beta$ . *J Periodontal Res.* 1995 Nov;30(6):382-9.
59. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000.* 2006;40:29-49.
60. Bartold PM, Haynes DR. Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1991 Jul;26(4):339-45.
61. Ren X, van der Mei HC, Ren Y, Busscher HJ. Keratinocytes protect soft-tissue integration of dental implant materials against bacterial challenges in a 3D-tissue infection model. *Acta Biomater.* 2019 Sep 15;96:237-246.
62. Lutey AHA, Gemini L, Romoli L, Lazzini G, Fusco F, Faucon M, et al. Towards Laser-Textured Antibacterial Surfaces. *Sci Rep.* 2018 Jul 4;8(1):10112.
63. Chen C, Enrico A, Pettersson T, Ek M, Herland A, Niklaus F, et al. Bactericidal surfaces prepared by femtosecond laser patterning and layer-by-layer polyelectrolyte coating. *J Colloid Interface Sci.* 2020 Sep 1;575:286-297.
64. Jalil SA, Akram M, Bhat JA, Hayes JJ, Singh SC, ElKabbash M, et al. Creating superhydrophobic and antibacterial surfaces on gold by femtosecond laser pulses. *Appl Surf Sci.* 2020 Mar 15;506:144952.

## ANEXOS

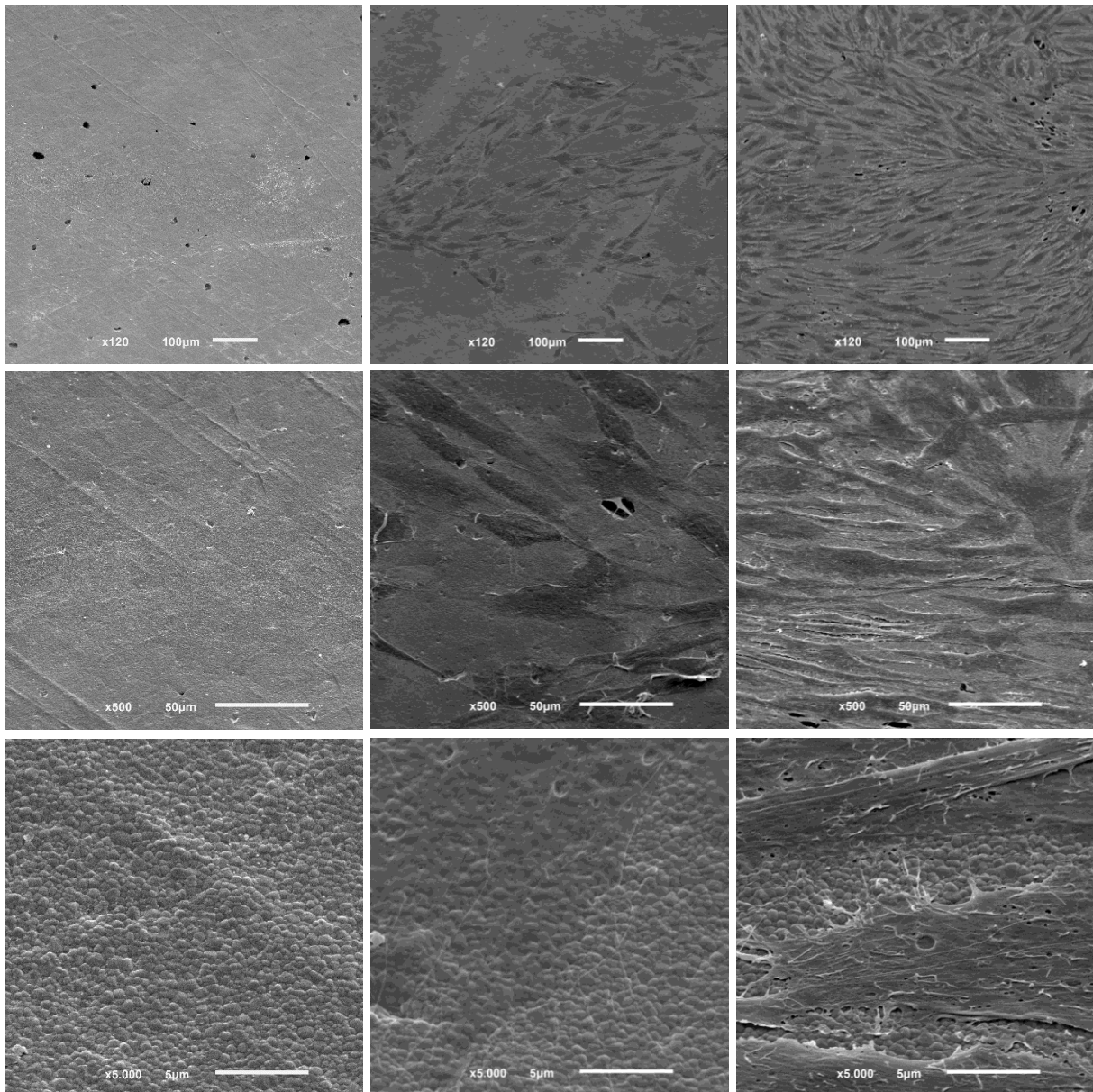
Imagens de FEG-SEM das superfícies de todos os grupos testados (A – sem tratamento; B - jateamento e ataque ácido; C - laser D10 P10; D – laser D20 P1), com ampliações de 120x, 500x e 5000x.

### *Grupo A*

*Inicial*

*1 dia*

*3 dias*

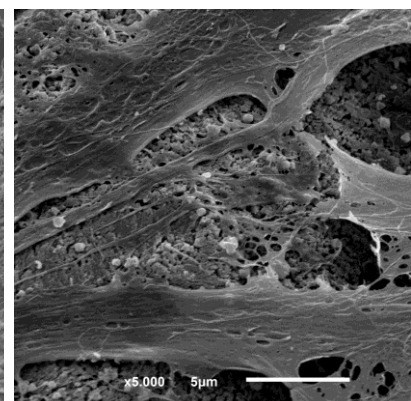
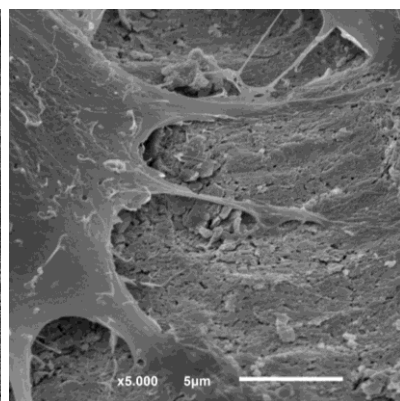
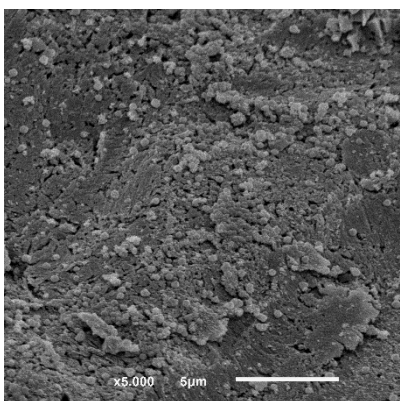
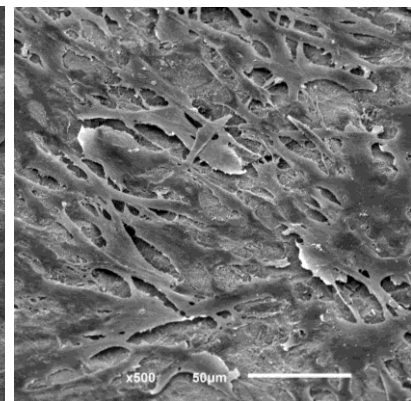
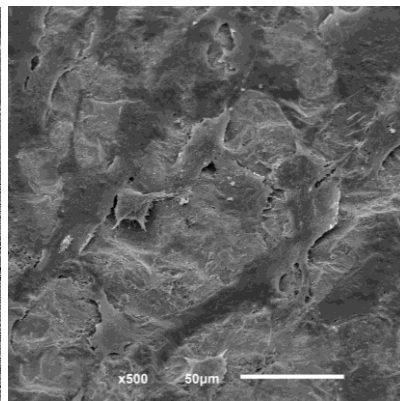
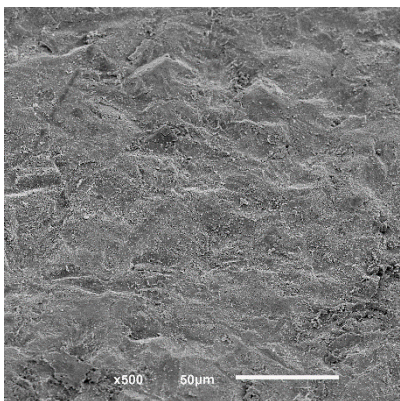
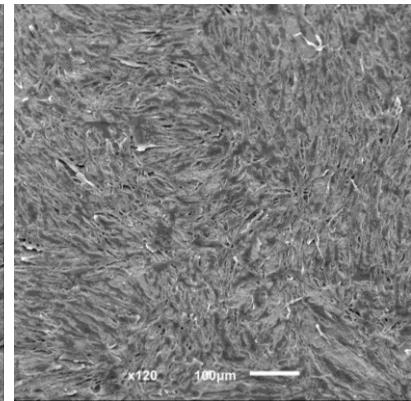
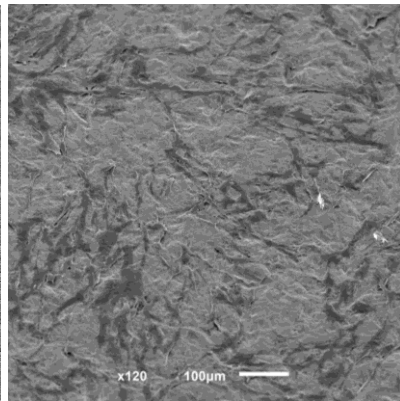
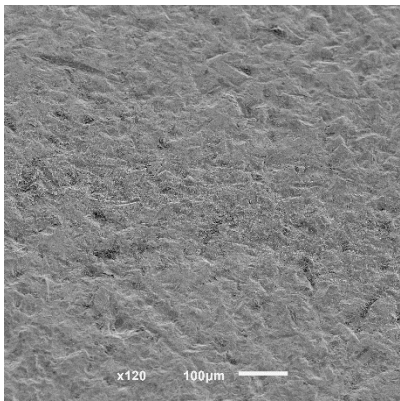


**Grupo B**

*Inicial*

*1 dia*

*3 dias*

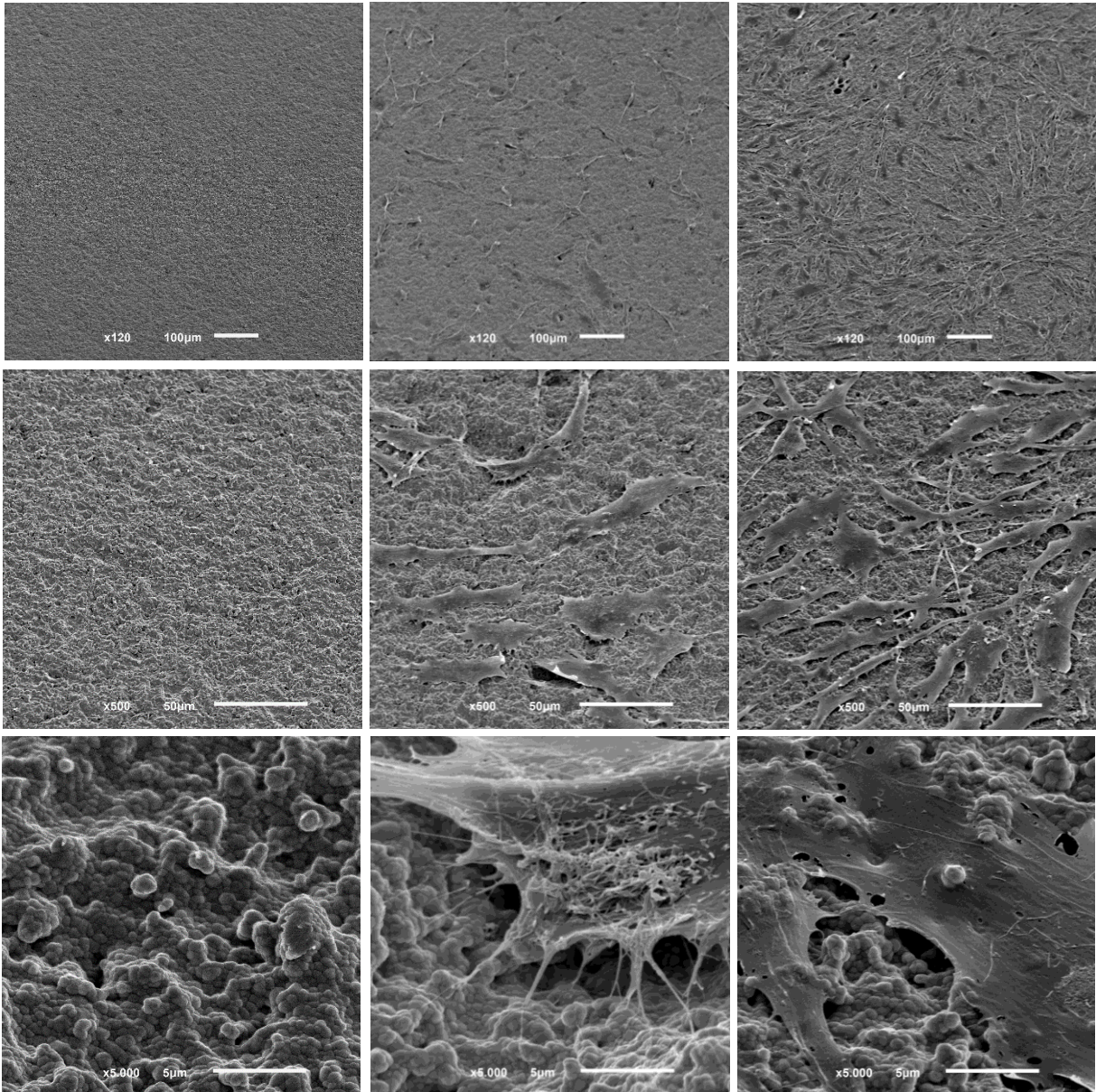


*Grupo C*

*Inicial*

*1 dia*

*3 dias*



*Grupo D*

*Inicial*

*1 dia*

*3 dias*

