

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



**Influência da texturização de superfícies de zircónia por laser
Nd:YAG à nano e micro escala no comportamento celular de
osteoblastos**

Filipa Alexandra Pinto Loureiro

Orientadores:

Professor Doutor António Duarte Sola Pereira da Mata

Professora Doutora Joana Rita Oliveira Faria Marques

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2020

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



**Influência da texturização de superfícies de zircónia por laser
Nd:YAG à nano e micro escala no comportamento celular de
osteoblastos**

Filipa Alexandra Pinto Loureiro

Orientadores:

Professor Doutor António Duarte Sola Pereira da Mata

Professora Doutora Joana Rita Oliveira Faria Marques

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2020

“Perante um obstáculo, a linha mais curta entre dois pontos pode ser a curva.”

Bertolt Brecht

Agradecimentos

Ao Professor Doutor António Mata, meu orientador, e investigador Principal do Grupo de Investigação em Biologia e Bioquímica Oral, pela sua sabedoria e resiliência que tem demonstrado ao longo destes anos e que, pelo seu exemplo muito me ensinou.

À Professora Doutora Joana Marques, minha orientadora, pela paciência e disponibilidade ao longo deste projeto. Pela motivação e todo o conhecimento que me transmitiu ao longo destes meses que são para mim imensuráveis.

À Professora Doutora Mariana Brito da Cruz, pelas horas partilhadas em laboratório, sítio onde muito aprendi com o seu conhecimento e que foi muito importante na realização desta dissertação.

Ao Professor Doutor Óscar Carvalho, por toda a ajuda e disponibilidade prestada ao longo deste projeto.

Ao Professor Doutor Duarte Marques, por me ter dado a oportunidade de integrar neste grupo de investigação que muito contribuiu para a minha formação tanto científica como académica.

À Neusa Silva, por todas as horas despendidas no laboratório onde o conhecimento partilhado se revelou indispensável para a elaboração desta dissertação. Por todo o apoio dado, principalmente nas horas mais difíceis, onde as suas palavras foram revitalizantes para a continuação deste trabalho.

Ao GIBBO, por todos os conhecimentos adquiridos ao longo destes últimos anos. Por me fazerem sentir aceite e por me proporcionarem momentos únicos.

À Ana Beatriz Cardoso e Sara Franco, por toda a amizade, apoio e momentos inesquecíveis ao longo destes anos.

À família, por todo o apoio prestado ao longo destes anos. Em especial aos meus pais que me deram a oportunidade de realizar este curso superior. Às minhas irmãs e ao André por me

ajudarem sempre que necessitei e, por me apoiarem nos momentos menos fáceis ao longo destes cinco anos.

Ao Chewie, por me transmitir sempre alegria e motivação quando estas faltavam.

Este projeto de dissertação teve o apoio da FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia – Portugal) no âmbito do projeto FunImp 01-0145-FEDER-030498.

Cofinanciado por:



Resumo

Objetivos: Avaliar o comportamento *in vitro* dos hFOB1.19 em contacto com diferentes superfícies de zircónia tetragonal policristalina estabilizada com ítrio (Y-TZP) texturizadas a laser Nd:YAG com padrões semelhantes aos obtidos por jateamento e ataque ácido.

Materiais e Métodos: Osteoblastos fetais humanos (hFOB 1.19) foram cultivados durante 14 dias, em Y-TZP sinterizada (grupo A), Y-TZP modificada por jateamento e ataque ácido (grupo B) e por laser Nd:YAG cujo padrão consistiu em sulcos paralelos e perpendiculares espaçados entre si por 10 µm (grupo C) e por 20 µm (grupo D). Viabilidade e proliferação celular foram avaliadas ao 1º, 3º, 7º e 14º dia; a quantificação da interleucina 1β e de osteocalcina ao 1º e 3º dia pela técnica de ELISA; obtenção de imagens de microscopia eletrónica de varrimento (FEG-SEM) e de fluorescência ao 1º e 3º dia. A comparação entre os diferentes grupos foi realizada com recurso ao teste *one-way* ANOVA ou ao de Kruskal-Wallis, de acordo com o mais apropriado, e o teste de Tukey a fim de identificar diferenças estatisticamente significativas entre grupos. O nível de significância estabelecido foi $p < 0.05$.

Resultados: Relativamente à viabilidade e proliferação celular, apenas se observaram diferenças estatisticamente significativas aos 7 dias de cultura, com valores superiores para o grupo A comparativamente ao grupo B ($p=0,016$). Na produção de interleucina 1β e de osteocalcina não se verificaram diferenças significativas, exceto aos 3 dias onde se verificou um aumento na produção de interleucina 1β no grupo D comparativamente ao grupo A ($p=0,010$). Pelas imagens de FEG-SEM e de fluorescência, verificou-se em todos os grupos adesão celular inicial no 1º dia e sem diferenças na morfologia celular.

Conclusão: O comportamento *in vitro* dos hFOB 1.19 parece ser equivalente entre as superfícies de zircónia texturizadas a laser Nd:YAG e as superfícies jateadas e submetidas a ataque ácido.

Palavras-chaves: “Laser Nd-YAG”; “hFOB 1.19”; “Y-TZP”; “implantes dentários”

Abstract

Aim: Evaluate the behavior of hFOB1.19 in contact with different surfaces of yttrium-stabilized polycrystalline zirconia (Y-TZP) Nd:YAG laser textured with patterns similar to the obtained by sandblasting and acid-etching.

Materials and Methods: Human fetal osteoblasts (hFOB 1.19) were cultured during fourteen days on sintered Y-TZP (group A), sandblasting and acid-etching Y-TZP (group B) and Nd:YAG laser Y-TZP which pattern consisted parallel and perpendicular lines crossing 10 μm (group C) or 20 μm (group D) apart from each other. Cell viability and proliferation were assessed after one, three, seven, and fourteen days; quantification of interleukin 1 β and osteocalcin after one and three days using the ELISA technique. Morphology and cell adhesion were observed using scanning electron microscopy (FEG-SEM) and fluorescence microscopy after one and three days of culture. The comparison between groups was performed using the one-way ANOVA test or the Kruskal-Wallis test, according to the most appropriate, and the Tukey post-hoc test to identify statistically significant differences between groups. The level of significance was $p < 0.05$.

Results: Cell viability and proliferation were only statistically significant after seven days of culture, with higher values for group A compared to group B ($p = 0.016$). In the production of interleukin 1 β and osteocalcin there were no significant differences, except after three days where there was an increase in the production of interleukin 1 β in group D compared to group A ($p = 0.010$). From the FEG-SEM and fluorescence images, initial cell adhesion was verified in all groups after one day and no differences were observed in cell morphology.

Conclusion: The in vitro behaviour of hFOB 1.19 appears to be equivalent between the Nd:YAG laser-textured zirconia surfaces and sandblasting and acid-etching surfaces.

Keywords: “Nd:YAG laser”, “hFOB1.19”, “Y-TZP”, “dental implants”.

Índice

Introdução.....	1
Objetivos	7
Material e métodos	8
Discos	8
Culturas celulares	9
Viabilidade e proliferação celular.....	10
Interleucina 1 β - Humana	10
Osteocalcina Humana	11
Microscopia Eletrônica de Varrimento.....	11
Microscopia de Fluorescência	12
Análise estatística	12
Cálculo da dimensão amostral e poder estatístico	13
Resultados	14
Rugosidade	14
Viabilidade e proliferação celular.....	14
Interleucina 1 β – Humana.....	15
Osteocalcina Humana	16
Microscopia Eletrônica de Varrimento.....	16
Microscopia de Fluorescência	19
Discussão.....	20
Conclusão	25
Bibliografia.....	26

Índice de Gráficos e Figuras

Gráfico 1- Resultados de viabilidade celular como média \pm desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos A, B, C e D às 24 horas, 3, 7 e 14 dias de cultura (n=16). Os testes estatísticos utilizados: one-way ANOVA e o teste post-hoc de Tukey. Estatisticamente significativo: * $p > 0,05$	14
Gráfico 2 – Resultados dos raios de proliferação osteoblástica calculado a partir da média \pm desvio padrão dos resultados de intensidade de fluorescência obtidos entre os 7 dias / 1 dia, 14 dias / 7 dias e 14 dias / 1 dia. Os testes estatísticos utilizados: one-way ANOVA e o teste post-hoc de Tukey. Estatisticamente significativo: * $p > 0,05$	15
Gráfico 3 – Resultados da produção de Interleucina 1β – Humana como média \pm desvio padrão em pg/mL às 24 horas e aos 3 dias de cultura (n=8). Teste estatístico: Kruskal-Wallis. Estatisticamente significativo: * $p > 0,05$	15
Gráfico 4 - Resultados da produção de Osteocalcina Humana como média \pm desvio padrão em pg/mL às 24 horas e aos 3 dias de cultura (n=8). Teste estatístico: Kruskal-Wallis. Estatisticamente significativo: * $p < 0,05$	16
Figura 1 - Imagens de microscopia eletrônica de varrimento da superfície dos discos sem células, após 24 e 72 horas de cultura, dos grupos A, B, C e D. Ampliações de 120, 500 e 5000x.	18
Figura 2 - Imagens de microscopia de fluorescência da superfície dos discos após 24 e 72 horas de cultura, dos grupos A, B, C e D. Ampliação de 100x. Núcleo corado a vermelho (Iodeto de propídeo) e citoesqueleto-actina corado a verde (Faloidina)..	19

Abreviaturas

STP – Partículas de titânio

UA – Unidades Arbitrárias

v/v – Percentagem volúmica

W - Watt

Y-TZP – Zircónia tetragonal policristalina estabilizada com ítrio

µl - Microlitro

µm – Micrómetro

cm² – Centímetro quadrado

CMEMS – Unidade de Investigação em Microssistemas 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

hFOB – *Human fetal osteoblast cell line*

kHz – Quilo-hertz

Laser – *Light amplification by stimulated emission of radiation*

mg/ml – Miligramas por mililitro

mJ- Micro-joule

mm/s – Milímetros por segundo

Nm - Nanómetro

°C – Graus Celsius

PBS – Tampão fosfato salino

pg/mL – Picograma por mililitro

SaOs-2 – *Human Osteosarcoma Cell Line*

SPH – Partículas de fosfato de cálcio

HA- Hidroxiapatite

BIC – Contacto osso implante

RT – Torque de remoção

N – Newton

UV – Radiação Ultravioleta

Nd:YAG - *Neodymium Doped Yttrium–Aluminum–Garnet*

HF - Ácido fluorídrico

MgO-PSZ - Zircónia parcialmente estabilizada com óxido de magnésio

Introdução

Atualmente a reabilitação dentária com implantes é um tratamento bastante comum. O sucesso dos implantes dentários encontra-se diretamente relacionado com o princípio da osteointegração, processo biológico e dinâmico que conduz ao contacto direto estrutural e funcional entre o osso e a superfície do implante. ^(1,2)

O titânio comercialmente puro (Ti) e as suas ligas (principalmente Ti-6Al-4V) têm sido considerados, ao longo dos anos, o material de eleição para a produção de implantes dentários pelas suas distintas propriedades mecânicas e biológicas, nomeadamente elevada resistência à corrosão e biocompatibilidade. ⁽³⁻⁵⁾ Contudo, este material apresenta desvantagens como a descoloração dos tecidos peri-implantares, em casos de recessões gengivais ou de biótipos gengivais finos, o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade e a libertação de iões metálicos devido a processos de corrosão. ^(3,6-8)

Com o intuito de ultrapassar as desvantagens dos implantes de Ti, surgiram os implantes de cerâmica. ⁽⁹⁻¹¹⁾ Uma das primeiras cerâmicas empregues foi a alumina (Al_2O_3), que devido às suas propriedades mecânicas, como elevado módulo de elasticidade e baixa tenacidade, que o tornam propenso à fratura perante cargas desfavoráveis, foi retirado do mercado. ^(10,12,13)

Como alternativa aos implantes de Al_2O_3 , surgiram os implantes de zircónia (ZrO_2). ^(2,10,11,14) As principais vantagens da ZrO_2 residem na sua cor branca e opaca, na sua excelente biocompatibilidade, nas suas propriedades mecânicas e na sua diminuta afinidade para a placa bacteriana. ^(2,13,15) Outra vantagem dos implantes de ZrO_2 reside nos seus resultados semelhantes de osteointegração comparativamente aos implantes de Ti. ⁽¹⁶⁾ De acordo com a revisão sistemática de Nishihara H. *et al*, os valores de contacto osso-implante (BIC) variam entre 25-88% para os implantes de Ti e 24-85% para os de ZrO_2 e o torque de remoção (RT) nos implantes de Ti é entre 7-74 Newton (N) e nos implantes de ZrO_2 é 9-78N. ⁽¹⁷⁾

A ZrO_2 apresenta três estruturas cristalinas distintas: monolítica (m), tetragonal (t) e cúbica (c). ^(9,11) À temperatura ambiente a ZrO_2 apresenta uma estrutura monolítica. A adição de óxidos estabilizadores, como óxido de magnésio (MgO), óxido de cálcio (CaO) e óxido de ítrio (Y_2O_3) permite a manutenção da fase tetragonal à temperatura ambiente. ^(9,11) A adição destes óxidos revela-se importante, uma vez que a transformação da fase tetragonal para a monolítica conduz a um aumento de volume entre 3-4%, levando à criação fissuras na cerâmica, e conseqüentemente à sua fratura. ^(9,11)

A zircónia tetragonal policristalina estabilizada com ítrio (Y-TZP) com 2% a 3% moles (mol) de Y_2O_3 é a cerâmica de eleição na produção de implantes dentários, pelas suas distintas propriedades mecânicas e físicas, como elevada resistência à flexão e fratura; e pelas suas propriedades biológicas como elevada biocompatibilidade e baixa afinidade para com os biofilmes bacterianos. ^(1,2,16,18)

Como mencionado inicialmente, o sucesso dos implantes dentários encontra-se diretamente relacionado com a osteointegração. As características das superfícies implantares são cruciais, uma vez que é nessa área que ocorrem as reações biológicas que conduzem, em condições favoráveis, à desejada osteointegração. ⁽⁴⁾ Adicionalmente ao tipo de material, as modificações no desenho do corpo e na superfície dos implantes afetam a osteointegração, na medida em que promovem uma maior área de superfície, contribuindo, deste modo, para o aumento da interação osso-implante, aceleram a formação de osso e melhoram a estabilidade primária do implante. ⁽¹⁹⁾ As propriedades das superfícies apontadas como determinantes para a osteointegração são a topografia, nomeadamente a composição química a rugosidade e a molhabilidade. ^(17,20,21) Relativamente à molhabilidade, a deposição de proteínas e a adesão celular têm-se revelado superior em superfícies hidrofílicas, promovendo uma maior deposição óssea à volta dos implantes, comparativamente a superfícies hidrofóbicas. ⁽²⁰⁾ O estudo *in vitro* de Hao L. *et al.*, averiguou que no grupo MgO-PSZ tratado com laser CO_2 apresentava valores de molhabilidade superiores ao do grupo de controlo (MgO-PSZ sem tratamento). Estes valores traduziram-se na presença de uma maior densidade de hFOB, ao fim de 24 horas, no grupo MgO-PSZ tratado com laser CO_2 comparativamente ao grupo de controlo. ⁽²¹⁾ Uma explicação para estes resultados pode advir do facto de o aumento da molhabilidade das superfícies promover a adesão de fibrina, estabelecendo desde cedo uma matriz tridimensional através da qual ocorre a migração dos osteoblastos até à superfície implantar. ⁽²⁰⁾ Outra propriedade importante para a osteointegração dos implantes é a composição química da superfície implantar. Tal como a molhabilidade, a adsorção de proteínas na superfície implantar e consequentemente a adesão celular depende da composição química da superfície. ⁽²⁰⁾ O estudo realizado por Aboushelib M. e Shawky R. avaliou a capacidade de osteogénese da superfície de zircónia texturizada e revestida com hidroxiapatite (HA). Os resultados do estudo revelaram uma maior percentagem de osso neoformado ($33\pm 14\%$) na zircónia revestida com HA comparativamente com a zircónia sem revestimento ($21\pm 11\%$). ⁽²²⁾ A topografia da superfície, particularmente a rugosidade, é outro fator importante no sucesso da osteointegração dos implantes. Estudos *in vitro* têm evidenciado que a topografia de superfície influencia a

proliferação e a diferenciação dos osteoblastos. ⁽²³⁾ O estudo *in vitro* de Yamashita D. *et al.*, avaliou a influência da rugosidade na adesão celular inicial das células osteoblásticas em diferentes superfícies implantares. As amostras com uma rugosidade média de 1,04 μm demonstraram um maior número de células aderidas, num intervalo de 24 horas, comparativamente às amostras com uma rugosidade média de 0,24 μm . ⁽²³⁾ De acordo com a literatura, a resposta dos osteoblastos depende da topografia; superfícies lisas (rugosidade média inferior a 0,5 μm) e minimamente rugosas (rugosidade média de 0,5-1 μm) demonstram uma resposta celular diminuta comparativamente a superfícies rugosas. No entanto, também se encontra descrito que superfícies moderadamente rugosas (rugosidade média de 1-2 μm) apresentam uma resposta celular superior comparativamente a superfícies rugosas (rugosidade média superior a 2 μm). ^(20,23-25) De uma forma geral, uma rugosidade média entre 1 e 2 μm é considerada como ideal para as superfícies implantares, uma vez que otimizam o contacto implante-célula. ^(20,23,24)

Pelas razões acima mencionadas, diferentes técnicas químicas e mecânicas foram desenvolvidas com o intuito de modificar as propriedades das superfícies implantares, particularmente a rugosidade e a molhabilidade. ⁽¹³⁾ Diversos estudos afirmam que as diferentes técnicas de tratamentos de superfície de implantes influenciam a adesão, proliferação, morfologia e diferenciação dos fibroblastos e dos osteoblastos. ^(1,2,4,11) Apresentam como objetivo aumentar a performance biológica da superfície implantar, modificando as propriedades da mesma, mas preservando o material. ⁽¹⁸⁾ Podem ser divididas em dois grandes grupos: superfícies modificadas por métodos de adição e superfícies modificadas por métodos de subtração. ^(4,18) Os métodos de adição consistem em depositar uma camada sobre a superfície implantar. Exemplos destes métodos são a adição de componentes bioativos e o spray de plasma. Os métodos de subtração compreendem a remoção de uma camada da superfície implantar. O jateamento de partículas, o ataque ácido e as modificações com recurso a laser constituem exemplos deste grupo. ⁽²⁶⁾

Particularizando primeiramente os métodos de adição, o spray de plasma representa a técnica mais comum deste grupo, sendo realizado com um gás ionizado aquecido entre 10 000°C e 30 000°C, e partículas projetadas a grande velocidade contra o corpo do implante. As partículas mais comumente utilizadas são de titânio (Spray de plasma de titânio - SPT) ou fosfato de cálcio (Spray de plasma de hidroxiapatite - SPH), criando espessuras de revestimento entre 10 e 40 μm para o SPT e entre 50 e 70 μm para o SPH. Uma desvantagem deste método reside na instabilidade do revestimento devido a processos de dissolução do mesmo, levando a uma

diminuição da resistência mecânica na interface revestimento-implante. ^(18-20,27) A criação de superfícies biomiméticas, ou seja, precipitação heterogênea de HA sob condições fisiológicas de temperatura e pH sobre os implantes, tem demonstrado promover a adesão e proliferação celular dos fibroblastos, osteoblastos e células do ligamento periodontal. ^(2,19,27) O estudo animal realizado por Aboushelib M. e Shawky R. avaliou a capacidade de osteogênese da superfície de zircônia texturizada e revestida com HA. Os resultados do estudo revelaram uma maior percentagem de osso neoformado ($33\pm 14\%$) na zircônia revestida com HA comparativamente com a zircônia sem revestimento ($21\pm 11\%$). ⁽²²⁾ No entanto, uma desvantagem das superfícies biomiméticas reside nas alterações de pH à volta do implante, devido a fenómenos de delaminação, podendo conduzir à falha do implante. ⁽²⁰⁾

Focalizando nos métodos de subtração, o jateamento e ataque ácido representam, atualmente, um dos métodos de eleição na modificação da superfície dos implantes de ZrO_2 . ⁽²⁸⁾ O jateamento de partículas, usado para a macrotexturização superficial dos implantes, consiste na ejeção de partículas, como óxido de alumínio (Al_2O_3) ou óxido de titânio (TiO_2), contra a superfície do implante, criando entalhes irregulares, que variam de acordo com a morfologia e tamanho das partículas e com as condições do jateamento (pressão, tempo de jateamento). A rugosidade média criada pelo jateamento de partículas varia entre 1,20 e 2,20 μm . Este método de tratamento de superfície apresenta como vantagem a produção de um padrão de abrasão homogêneo e anisotrópico. ⁽¹⁸⁾ Porém, as partículas usadas durante o jateamento, de acordo com análises de microscopia eletrónica de varrimento, permanecem na superfície do implante, mesmo, após processos de descontaminação, afetando a osteointegração dos implantes. ^(18,27,29) Outra desvantagem do jateamento é o seu efeito negativo nas propriedades de superfície implantar, uma vez que, induz a transformação da fase tetragonal para a monolítica. ^(10,17) O estudo *in vitro* de Qahtani W. *et al.* detinha essencialmente dois objetivos: comparar a rugosidade antes e após o processo de sinterização dos implantes de Y-TZP, sujeitando-os primeiramente ao jateamento de partículas de Al_2O_3 e avaliar o comportamento celular dos SAOS-2 nas diferentes superfícies. Verificou que no grupo jateado com 120 μm de Al_2O_3 apresentou uma rugosidade média e desvio padrão de $4,1\pm 0,1 \mu m$ e o grupo jateado com 250 μm de Al_2O_3 de $5,72\pm 0,17$. Após o processo de sinterização a rugosidade média diminuiu para $3,69\pm 0,08 \mu m$ e $5,39\pm 0,17 \mu m$ para os respetivos grupos. Apesar da diminuição da rugosidade média, concluíram que o jateamento da Y-TZP antes da sinterização representa um método adequado na obtenção de uma superfície rugosa e com potencial de osteointegração, preservando as propriedades mecânicas da Y-TZP e

consequentemente aumentando a estabilidade, a longo prazo, dos implantes de Y-TZP. ⁽¹⁰⁾ O jateamento de partículas seguido de ataque ácido, permite a obtenção de uma rugosidade homogênea, independentemente da forma e tamanho do material. Adicionalmente, o ataque ácido não apresenta o risco de ocorrência de delaminação do material, uma vez que não causa *stress* sobre o mesmo. No entanto, uma desvantagem deste método é a possibilidade de alterar a composição química da superfície. A topografia criada, na escala micrométrica, pelo ataque ácido depende de tratamento de superfícies prévios, da composição da solução acídica, da temperatura e do tempo de tratamento. ^(18,19) O estudo animal conduzido por Iinuma Y. et al. demonstrou que os grupos de implantes de Y-TZP, tratados com jateamento e ataque ácido ou jateamento, ataque ácido e radiação ultravioleta (UV) apresentaram um BIC superior, (80,39% e 85,87% respetivamente) em relação aos grupos de controlo (superfícies polidas) e de UV (58,10% e 50,32%). Verificaram que os implantes tratados com jateamento e ataque ácido ou jateamento, ataque ácido e UV apresentaram rugosidade média de superfície estatisticamente superior nos grupos de controlo e de UV e que os implantes tratados com jateamento, ataque ácido e UV apresentaram uma superfície bastante hidrofílica. ⁽³⁰⁾

Outro método subtrativo mencionado precedentemente é o laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), que é um feixe, convergente, coerente e monocromático de radiação eletromagnética. Existem diversos tipos de laser, o laser no estado sólido (Nd:YAG e laser de fibra), o laser de líquido (corante orgânico líquido), o laser de gás (CO₂), o laser de elétron livre (FEL) e o laser semiconductor (laser de díodo). O laser pode emitir a luz de modo contínuo ou em modo pulsado em que esta é emitida entre dois pulsos sucessivos. ⁽³¹⁾ Na área da Medicina Dentária, as modificações de superfície com recurso ao laser têm revelado um grande potencial na otimização das propriedades de superfície dos implantes dentários como a rugosidade e a molhabilidade das superfícies. ⁽¹⁸⁾ Esta tecnologia apresenta diversas vantagens, particularmente por ser um sistema de processamento com um elevado grau de controlo e reprodutividade e com a capacidade de modificar a superfície implantar com padrões texturizados complexos desde a macro à nano escala sem a necessidade de contacto direto com o implante, diminuindo o risco de contaminação, contrariamente aos métodos de jateamento e ataque ácido. ⁽²⁹⁾ O laser Nd:YAG (Neodymium Doped Yttrium–Aluminum–Garnet) é bastante utilizado em Medicina Dentária. A irradiação do laser Nd:YAG aumenta a rugosidade superficial através da ablação e indução aleatória da cristalização, comparativamente ao laser de CO₂. Uma desvantagem na utilização do laser Nd:YAG é a criação de microfissuras na superfície da zircónia provocadas por alterações térmicas, podendo, também, induzir a

transformação da fase tetragonal para a monolítica. ⁽³²⁾ O estudo de Hoa L. *et al.* detinha como objetivo investigar a adesão dos osteoblastos em superfícies implantares modificadas por laser CO₂. Verificaram que na Y-TZP não tratada menos de 10% da superfície continha células aderidas. Por outro lado, na Y-TZP tratada com laser de intensidade 1.80 kW/cm² e 2.25 kW/cm² apresentaram 70 e 90% da superfície com células aderidas, respetivamente. No entanto, averiguaram que a utilização do laser CO₂ diminui a rugosidade média dos implantes comparativamente aos grupos de controlo, mas aumentava a energia de superfície e consequentemente a molhabilidade. ⁽³³⁾

A utilização de laser no tratamento de superfícies implantares aparenta ser uma técnica promissora. No entanto, os parâmetros ótimos de utilização, bem como o tipo de texturização ainda não se encontram bem definidos. O estudo *in vitro* de Fernandes B. *et al.* detinha como objetivo principal avaliar o comportamento dos hFOB 1.19 em contacto com superfícies de zircónia com padrões específicos criados com recurso a laser Nd:YAG. Verificaram que a resposta celular dos hFOB 1.19 em contacto com as superfícies de zircónia tratadas com laser Nd:YAG foi superior comparativamente com as superfícies de zircónia tratadas com jateamento e ataque ácido. Porém, não foram detetadas diferenças na resposta celular entre as diferentes superfícies tratadas com laser Nd:YAG, ficando por determinar quais os padrões e parâmetros ótimos para a utilização do laser. ⁽³⁴⁾

Objetivos

O principal objetivo desta dissertação foi estudar o comportamento *in vitro* dos hFOB 1.19 em contacto com diferentes superfícies de zircónia texturizadas a laser Nd:YAG com padrões de texturização semelhantes aos obtidos por jateamento e ataque ácido.

As hipóteses consideradas neste estudo foram:

H₀: Não existem diferenças no comportamento celular dos hFOB1.19 cultivados em superfícies de zircónia tratadas com laser e com jateamento e ataque ácido.

H₁: Existem diferenças no comportamento celular dos hFOB1.19 cultivados em superfícies de zircónia tratadas com laser e com jateamento e ataque ácido.

O desenvolvimento e caracterização do padrão texturizado a laser Nd:YAG por forma a mimetizar o padrão obtido pelo tratamento de jateamento e ataque ácido, método considerado como *gold standard*, foi realizado na Unidade de Investigação em Microsistemas Eletromecânicos da Universidade do Minho.

Material e métodos

Discos

O desenvolvimento, produção e caracterização das propriedades físicas e mecânicas dos discos de zircónia foram realizados pela Universidade do Minho, na Unidade de Investigação em Microssistemas Eletromecânicos da Universidade do Minho (CMEMS). A avaliação do comportamento celular subjacente a este trabalho foi concretizada no Laboratório de Cultura Celular da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa (FMDUL).

Os discos de zircónia desenvolvidos foram produzidos a partir do pó de 3% mol de zircónia tetragonal policristalina estabilizada com ítrio (3Y-TZP) prensado (Tosoh Corporation©, Japão). Cada grupo foi constituído por 12 discos com 8 mm de diâmetro e 2 mm de altura. No entanto, estes foram produzidos com 10 mm de diâmetro e 2,5 mm de altura para compensar a contração ocorrida durante a sinterização.

O laser utilizado na texturização dos discos foi o laser Nd:YAG (Sisma ©, Vicenza, Itália) com as seguintes propriedades: 0,06W de potência, 1064µm de comprimento de onda, 20 KHz de frequência, 128 mm/s de velocidade. Com recurso ao software Inskape conectado ao laser através de um computador permitiu a criação de padrões de texturização específicos.

Os discos pertencentes aos grupos designados de C e D foram texturizados a laser com uma passagem, apresentando um padrão com sulcos paralelos e perpendiculares espaçados entre si 10 µm e 20 µm respetivamente. Estas configurações e características resultaram de vários ensaios prévios e detinham como objetivo produzir um padrão mimetizando o obtido por jateamento e ataque ácido. Posteriormente à texturização os discos foram sinterizados.

Os discos do grupo B, após sinterização, foram jateados com partículas de Al₂O₃ com tamanho médio de 250 µm, a pressão constante de 6 bar durante 30 segundos, a uma distância de 10 mm e um ângulo de impacto de 90°. Após este procedimento, os discos foram imersos em ácido fluorídrico (HF 48%) durante 30 minutos à temperatura ambiente. O grupo denominado de A foi composto por discos de zircónia sinterizada.

A determinação da rugosidade média dos grupos A e B foi realizada com recurso a um perfilómetro SurfTest SJ-201 (Mitutoyo, Tóquio, Japão) e para os grupos C e D com o perfilómetro SurfTest SJ-210 (Mitutoyo, Tóquio, Japão).

Culturas celulares

Os osteoblastos fetais humanos (hFOB 1.19) empregues neste estudo, foram adquiridos do repositório da ATCC® (CRL-11372TM; American Culture Collection, Manassas, Virgínia, EUA).

Todos os procedimentos de manipulação de culturas celulares foram realizados com material estéril, em condições de assepsia e numa câmara de fluxo laminar (Biobase®, Jinan, China).

Em todos os ensaios foram utilizados hFOB 1.19 com uma quarta passagem com o intuito de certificar a homogeneidade do comportamento celular entre os vários ensaios.

Os hFOB 1.19 foram descongelados e cultivados em dois frascos de 75cm³ (VWR™, Radnor, Pensilvânia, EUA) com meio de cultura constituído numa proporção de 1:1 v/v de Ham's F12 Medium (Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA) e Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM (Biowhittaker™, Lonza™, Basileia, Suíça) e complementado com 0.3 mg/mL de G418 (InvivoGen, Toulouse, França) e soro bovino fetal 10% (Biowest, Nuaille, França).

Os osteoblastos foram incubados numa incubadora (Memmert®, Schwabach, Alemanha) cujas condições ambientais eram 5% de CO₂, 98% de humidade e 37 °C de temperatura. O meio de cultura foi trocado após vinte e quatro horas de cultura e durante o período de crescimento celular a cada dois dias.

Quando os hFOB 1.19 atingiram uma confluência aproximadamente de 80% foram tripsinizados, utilizando Tripsina-EDTA (Lonza™, Basileia, Suíça) e a contagem das células viáveis, ou seja, não coradas com Trypan-Blue (AMRESCO®, Solon, Ohio, EUA), foi realizada numa câmara de Neubauer (Laboroptik Ltd., Lancing, Reino Unido).

Os discos de zircónia esterilizados foram colocados numa placa de cultura de 48 poços (Corning Inc®, Corning, Nova Iorque, EUA) e incubados durante trinta minutos com o meio de cultura dos hFOB 1.19. Após este período, as células foram semeadas sobre os discos com uma densidade de 1×10^4 células/poço e 500µm de meio de cultura por poço. O meio de cultura foi substituído após vinte e quatro horas depois de semear e a cada dois dias durante o período de crescimento celular.

Viabilidade e proliferação celular

Neste estudo, a avaliação da viabilidade e proliferação celular foi realizada tendo em consideração a quantificação da resorufina convertida a partir da rezasurina CellTiter-Blue® (Promega®, Estados Unidos), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. A conversão da rezasurina, corante azul não fluorescente, em resorufina, corante de cor rosa fluorescente, ocorre nas mitocôndrias de células viáveis. A quantificação da resorufina foi determinada através da intensidade de fluorescência (comprimentos de onda de excitação 530/30nm e emissão de 595/10nm) em unidades de fluorescência arbitrárias (UA) após 1, 3, 7 e 14 dias de cultura, com recurso a um leitor multimodo de microplacas (VICTOR Nivo™ HH3500, PerkinElmer®, Pontyclun, Reino Unido).

Interleucina 1 β - Humana

A quantificação da Interleucina 1 β – Humana foi realizada a partir do sobrenadante celular aos 1 e 3 dias de cultura, através de ensaios enzimáticos de imunoabsorção - ELISA, utilizando o Kit Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA (DY201-05 R&D Systems, Inc., Estados Unidos), de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente preparou-se a placa de 96 poços adicionando Mouse Anti-Human IL-1 β capture antibody a todos os poços, deixando a incubar durante a noite. Posteriormente prepararam-se as amostras standard utilizando diluições em série em duplicado preparadas a partir do Reagent Diluent Concentrate 2. Seguidamente adicionou-se o sobrenadante celular e as soluções standard aos respetivos poços e incubou-se durante duas horas. Após este período, adicionou-se sequencialmente, a cada poço, a solução de Biotinylated Mouse Anti-human IL-1 β detection antibody, a solução de Streptavidin-HRP e a solução de substrato, incubando-se a placa durante duas horas e 20 minutos respetivamente. Após estes períodos, adicionou-se a solução STOP a cada poço. Entre as várias soluções procedeu-se sempre ao protocolo de lavagem com Wash Buffer, com exceção do momento entra a aplicação de solução de substrato e solução STOP. Utilizando o leitor multimodo de microplacas (VICTOR Nivo™ HH3500, PerkinElmer®, Pontyclun, Reino Unido), configurado nos 450nm e nos 570 nm, determinou-se a absorvância de cada amostra.

Os resultados obtidos em unidades de absorvância (nm), foram transformados em pg/mL com recurso à regressão linear obtida a partir da curva de calibração.

Osteocalcina Humana

A quantificação da Osteocalcina Humana foi realizada a partir do sobrenadante celular aos 1 e 3 dias de cultura, através de ensaios enzimáticos de imunoabsorção - ELISA, utilizando o Kit Human Osteocalcin DuoSet ELISA (DY1419-05 R&D Systems, Inc., Estados Unidos), de acordo com o protocolo do fabricante descrito anteriormente.

Os resultados obtidos em unidades de absorvância (nm), foram transformados em pg/mL com recurso à regressão linear obtida da curva de calibração.

Microscopia Eletrónica de Varrimento

Os hFOB 1.19 foram semeados sobre as amostras de discos com uma densidade 1×10^4 células/poço e com 500µm de meio de cultura por poço durante 3 dias.

Ao primeiro e terceiro dia de cultura, um disco de cada grupo foi transferido para uma placa de cultura de 48 poços (Corning Inc®, Corning, Nova Iorque, EUA) para fixação das amostras. Procedeu-se à lavagem com tampão fosfato-salino – PBS (VWR™, Radnor, Pensilvânia, EUA), e posteriormente foi adicionada uma solução de Glutaraldeído 2,5% (v/v) (VWR™, Radnor, Pensilvânia, EUA) a cada poço. Após uma hora, as mostras foram desidratadas com recurso a soluções aquosas de etanol (LaborSpirit Lda, Loures, Portugal) com as seguintes concentrações - 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% (v/v) - durante 30 minutos para cada solução. Foram deixadas a secar na câmara de fluxo laminar durante 2 horas e após este período armazenadas a 4°C até à sua visualização.

Para a visualização das amostras sob Microscopia Eletrónica de Varrimento – Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy (FEG-SEM) - FEI NOVA 200 Nano SEM, FEI, EUA, estas foram revestidas com um filme de 15 nm de ouro-paládio (Au-Pd) (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 Company, Watford, Reino Unido). Este passo foi realizado no serviço de Microscopia Eletrónica da Universidade do Minho – Escola de Engenharia.

As imagens eletrónicas secundárias foram realizadas com as seguintes ampliações 120, 500 e 5000x, a uma voltagem de aceleração de 10kV. A análise das mesmas foi efetuada por dois operadores calibrados, dando-se ênfase à morfologia celular, distribuição e estabelecimento de contacto inicial com os discos.

Microscopia de Fluorescência

Para coloração de fluorescência do citoesqueleto e núcleo dos hFOB 1.19, estes foram semeados sobre as amostras de discos com uma densidade 1×10^4 células/poço com 500µm de meio de cultura por poço durante os tempos pré-definidos.

Ao primeiro e terceiro dia de cultura, dois discos de cada grupo foram transferidos para uma placa de cultura de 48 poços (Corning Inc®, Corning, Nova Iorque, EUA) para fixação das amostras. Após lavagem com tampão fosfato-salino – PBS (VWR™, Radnor, Pensilvânia, EUA), foi adicionada uma solução de Formaldeído 4% (Applichem Panreac ITW Reagents®, Barcelona, Espanha) a cada poço durante 15 minutos. Decorrido este tempo, as amostras foram lavadas com PBS e permeabilizadas com solução de 0,1% Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich®, Hampshire, EUA). Foi adicionada uma solução de Faloidina (abcam®, Cambridge, Reino Unido) a cada poço e incubou-se à temperatura ambiente durante 20 minutos. Seguidamente, após lavagem, foi adicionado uma solução de Iodeto de Propídeo (Sigma-Aldrich®, Hampshire, EUA) durante 10 minutos. As amostras foram montadas em lâmina de vidro com estabilização através da aplicação do selante de superfície CoverGrip™ (Biotium®, Fremont, EUA) para preservar a intensidade do sinal de fluorescência durante a sua visualização. A visualização das amostras foi efetuada por microscopia de fluorescência com recurso ao microscópio OLYMPUS BX50 e câmara fotográfica de fluorescência Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, USA) acoplada a um software LAS-AF LITE v2.0 (Leica Microsystems, USA) com comprimento de onda de excitação de 493nm e comprimento de onda de emissão de 517nm para observação do citoesqueleto e comprimento de onda de excitação de 535nm e comprimento de onda de emissão de 617nm para o núcleo. Foram obtidas imagens de sobreposição a uma ampliação de 100x, que foram avaliadas posteriormente por 2 operadores calibrados.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software IBM® SPSS® 25.0 para Windows (SPSS, Chicago, EUA) e GraphPad Prism 6 para Windows (GraphPad Software, Inc. San Diego CA, EUA). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade de distribuição amostral para os vários grupos, e o teste de homogeneidade de variâncias de Levene foi aplicado para confirmar a homogeneidade de variâncias. A comparação entre os diferentes grupos para a secreção da Interleucina 1β – Humana e Osteocalcina Humana e da viabilidade celular foi realizada com base na análise da variância em 1 sentido de medidas

repetidas com recorrência (*one-way* ANOVA) ou testes de Kruskal-Wallis, de acordo com o mais apropriado, com recurso a testes *post-hoc* de Tukey a fim de identificar diferenças estatisticamente significativas entre grupos. O nível de significância estabelecido foi $p < 0.05$. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

Cálculo da dimensão amostral e poder estatístico

As estimativas da dimensão amostral para cada uma das hipóteses testadas foram executadas tendo por base uma taxa de erro tipo I (α) de 0.05 e de poder estatístico de 0.80 (β).

Com base em resultados prévios de viabilidade celular em duas superfícies implantares modificadas aos 14 dias de observação (resultados obtidos em discos de ZrO_2 e ZrO_2 com fosfato β tricálcico com culturas celulares de hFOB 1.19)⁽³⁵⁾ e recorrendo-se ao simulador G*Power 3.1.9.0 para Mac, (Dusseldorf, Alemanha)⁽³⁶⁾, para o cálculo do tamanho da amostra, foi determinado um $N = 12$ para cada grupo como necessário para detetar uma dimensão de efeito de 1,4 com poder estatístico de 0,80. A dimensão final da amostra foi ampliada para $n = 16$, a fim de permitir a realização de 4 ciclos de ensaios consecutivos com 4 amostras por grupo.

Resultados

Rugosidade

Como mencionado anteriormente, a caracterização das propriedades físicas e mecânicas dos discos de zircônia foram realizados na Universidade do Minho, na Unidade de Investigação em Microssistemas Eletromecânicos da Universidade do Minho (CMEMS).

Os resultados da rugosidade média do grupo A foi $0,14 \pm 0,03 \mu\text{m}$, a do grupo B $2,01 \pm 0,07 \mu\text{m}$, grupo C $1.539 \pm 0.143 \mu\text{m}$ e a do grupo D $1.609 \pm 0.158 \mu\text{m}$.

Viabilidade e proliferação celular

De acordo com o gráfico 1, todos os grupos apresentaram um aumento da viabilidade celular ao longo do tempo. Estatisticamente não existiram diferenças significativas entre grupos ($p > 0,05$), exceto no 7º dia entre o grupo A e B ($p = 0,016$). Apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas entre grupos, verifica-se uma tendência semelhante na viabilidade celular, ao longo do tempo, entre os grupos A, C e D.

De acordo com o gráfico 2, todos os grupos apresentaram um aumento na proliferação celular ao longo do tempo, exceto no grupo D em que entre o rácio 7/1 e o rácio 14/7 foi observada uma ligeira diminuição. Estatisticamente não existiram diferenças significativas entre grupos ($p > 0,05$), exceto no rácio 7/1 entre o grupo A e B ($p = 0,003$).

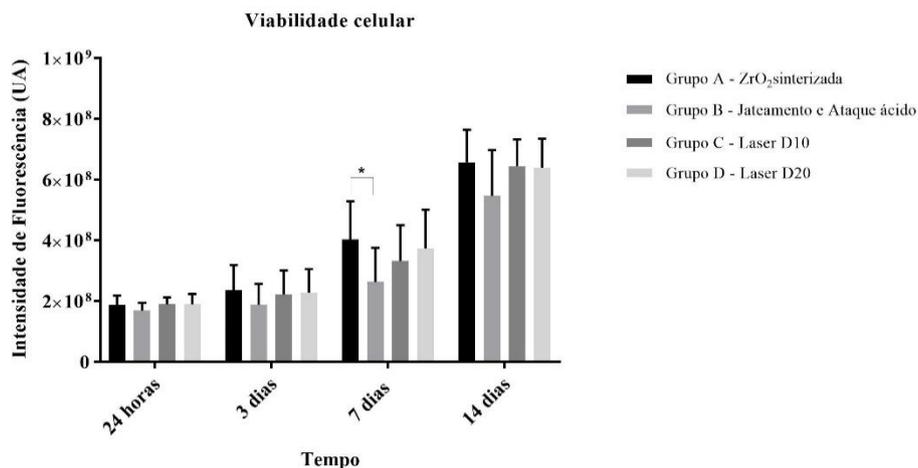


Gráfico 1- Resultados de viabilidade celular como média \pm desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos A, B, C e D às 24 horas, 3, 7 e 14 dias de cultura ($n=16$). Os testes estatísticos utilizados: one-way ANOVA e o teste post-hoc de Tukey. Estatisticamente significativo: * $p > 0,05$.

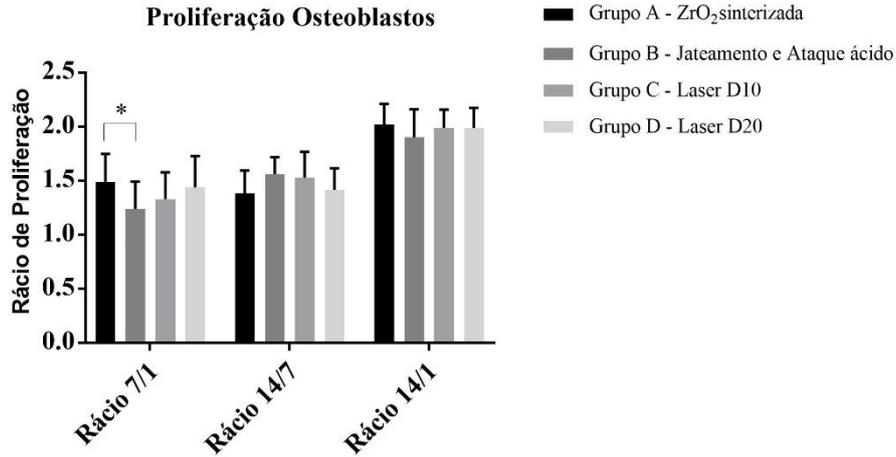


Gráfico 2 – Resultados dos rácios de proliferação osteoblástica calculado a partir da média \pm desvio padrão dos resultados de intensidade de fluorescência obtidos entre os 7 dias / 1 dia, 14 dias / 7 dias e 14 dias / 1 dia. Os testes estatísticos utilizados: one-way ANOVA e o teste post-hoc de Tukey. Estatisticamente significativo: * $p > 0,05$.

Interleucina 1 β – Humana

De acordo com o gráfico 3, os grupos A e C apresentaram uma diminuição na produção de Interleucina 1 β – Humana entre as 24 horas e os 3 dias, contrariamente aos grupos B e D em que a produção de Interleucina 1 β – Humana aumentou. Estatisticamente não foram observadas diferenças significativas entre grupos ($p > 0,05$), exceto no 3º dia em que se regista um aumento no grupo D comparativamente com o grupo A ($p = 0,010$).

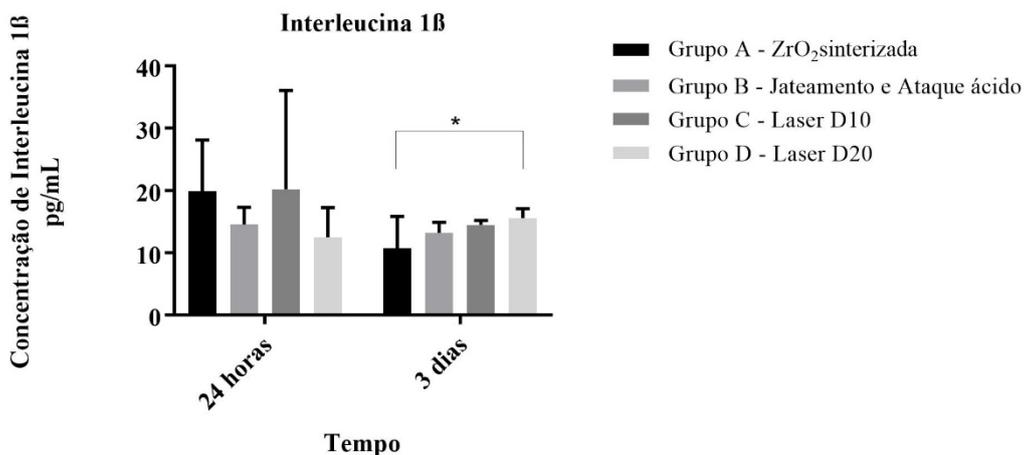


Gráfico 3 – Resultados da produção de Interleucina 1 β – Humana como média \pm desvio padrão em pg/mL às 24 horas e aos 3 dias de cultura ($n = 8$). Teste estatístico: Kruskal-Wallis. Estatisticamente significativo: * $p > 0,05$.

Osteocalcina Humana

De acordo com o gráfico 4, os grupos A, C e D apresentaram um aumento na produção de Osteocalcina Humana entre as 24 horas e os 3 dias, contrariamente ao grupo B em que a produção de Osteocalcina Humana diminuiu. Estatisticamente não existiram diferenças significativas entre grupos ($p > 0,05$).

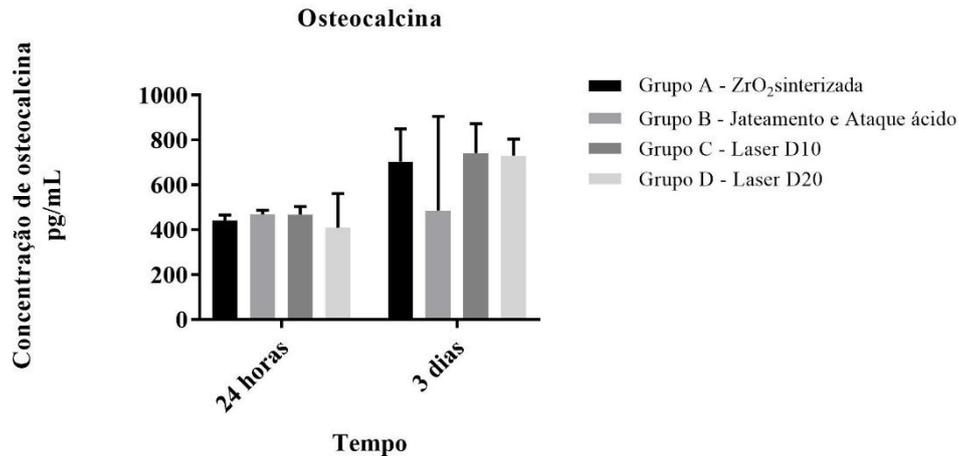


Gráfico 4 - Resultados da produção de Osteocalcina Humana como média \pm desvio padrão em pg/mL às 24 horas e aos 3 dias de cultura ($n=8$). Teste estatístico: Kruskal-Wallis. Estatisticamente significativo: * $p < 0,05$.

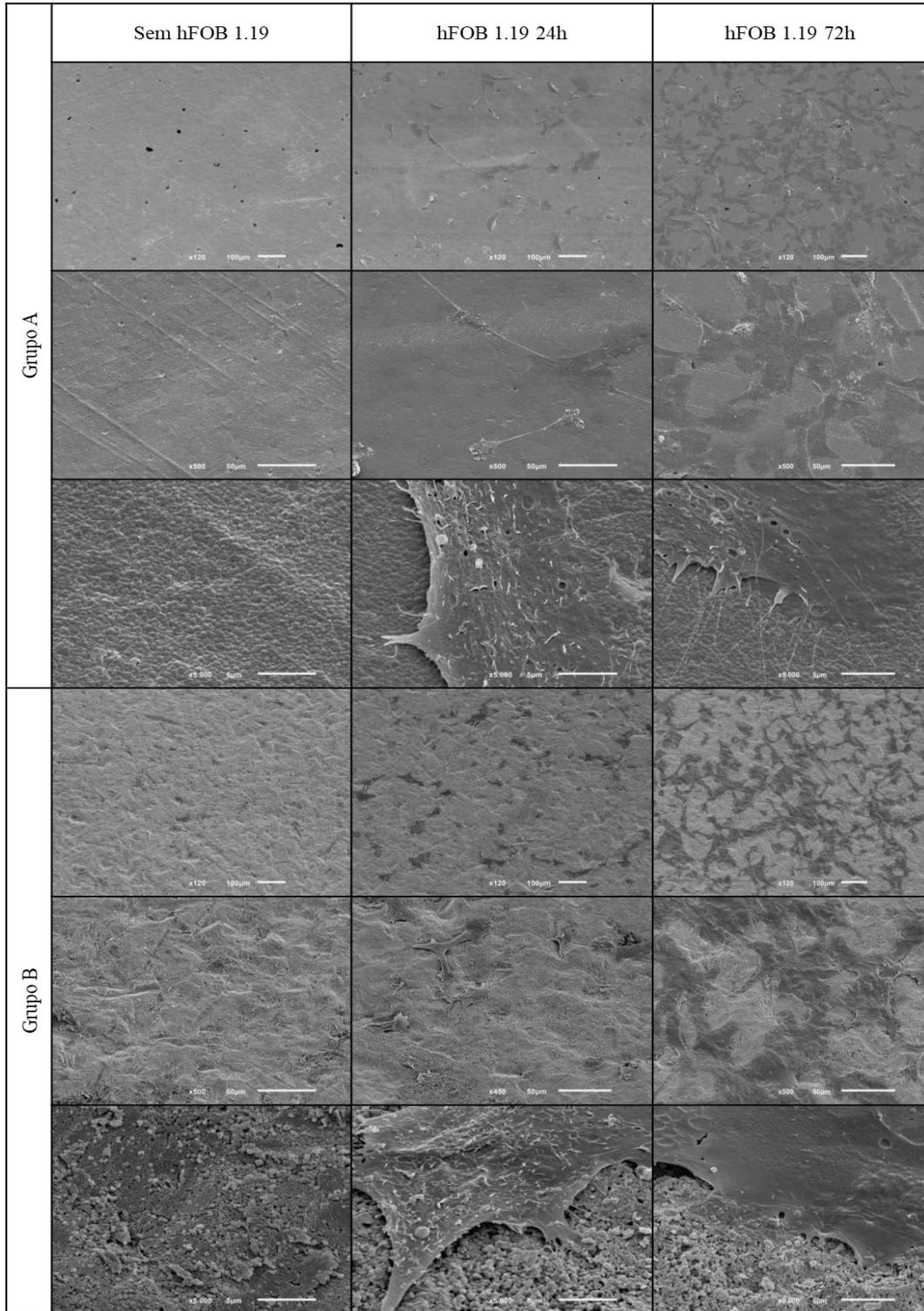
Microscopia Eletrônica de Varrimento

Em todos os grupos, às 24 horas e aos 3 dias de cultura celular, foram obtidas imagens da superfície dos discos por microscopia eletrônica de varrimento.

Verificou-se uma adesão celular inicial e ao longo do tempo semelhante em todos os grupos em estudo, não se encontrando diferenças na morfologia celular.

Nos grupos A, C e D, observa-se uma topografia de superfície idêntica, com aglomerados globulares de cristais de zircônia, separados entre si por sulcos e vales à escala nanométrica, conforme depreendido pela escala de referência das imagens. Nestes grupos, verifica-se que as extensões da membrana plasmática (filipódias) dos osteoblastos estabelecem contacto com o material, preferencialmente, nas zonas de sulcos e vales, ou seja, a um nível nanométrico.

No grupo B, o padrão de texturização difere comparativamente aos restantes grupos, observando-se uma topografia porosa com elevações e depressões proeminentes. Neste padrão, observa-se uma diminuição do contacto celular com o material e este estabelece-se essencialmente a um nível micrométrico.



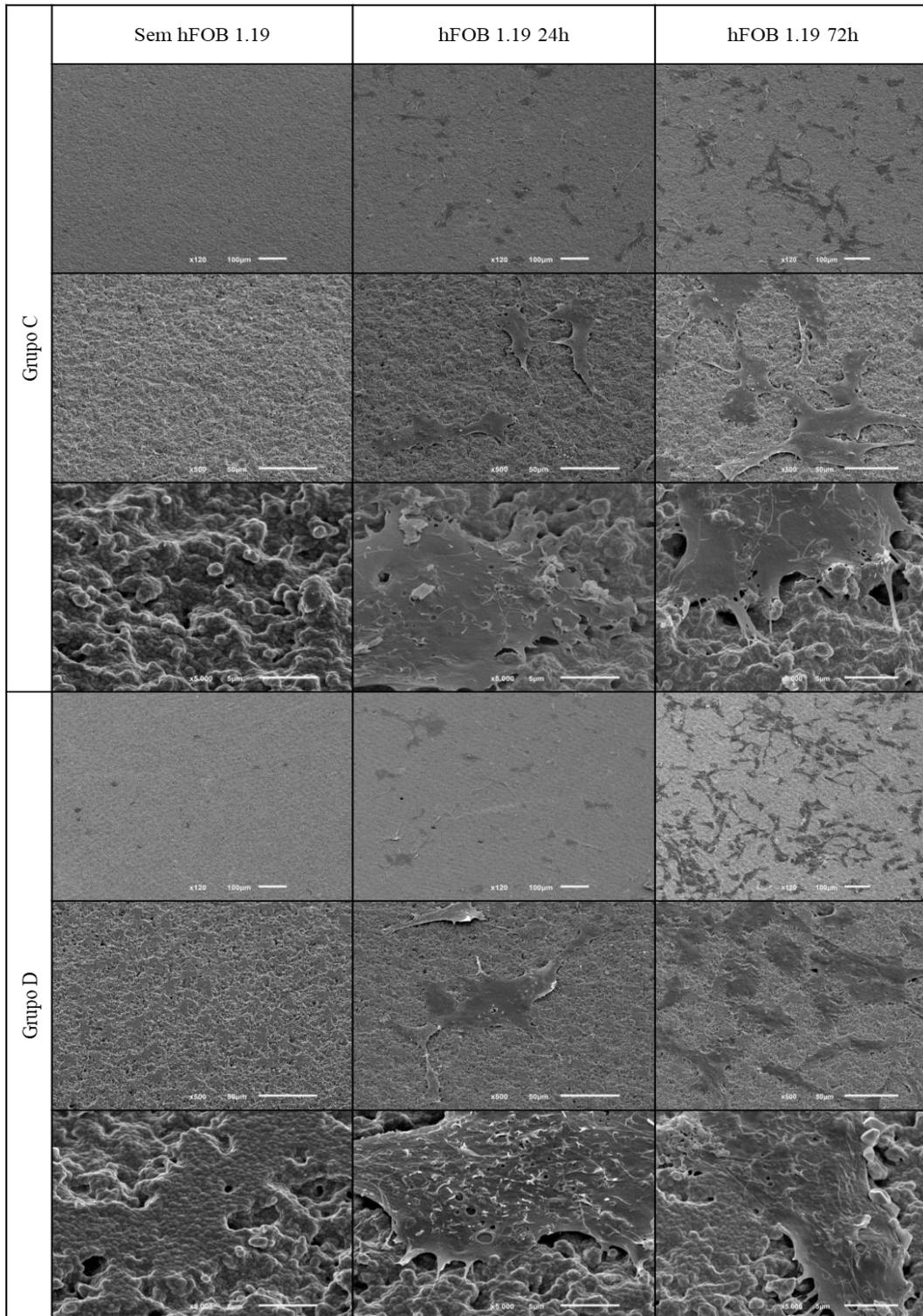


Figura 1 - Imagens de microscopia eletrônica de varrimento da superfície dos discos sem células, após 24 e 72 horas de cultura, dos grupos A, B, C e D. Ampliações de 120, 500 e 5000x.

Microscopia de Fluorescência

Em todos os grupos, às 24 horas e aos 3 dias de cultura celular, foram obtidas imagens de sobreposição do citoesqueleto-actina (corado a verde) e do núcleo (corado a vermelho) dos osteoblastos de todos os grupos. Em todos os grupos, verifica-se um aumento do número de células entre as 24 horas e as 72 horas, apresentando uma morfologia osteoblástica dentro dos limites da normalidade. As imagens de fluorescência corroboram com as imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varrimento, evidenciando um alinhamento do citoesqueleto em função dos contactos celulares e extensões citoplasmáticas.

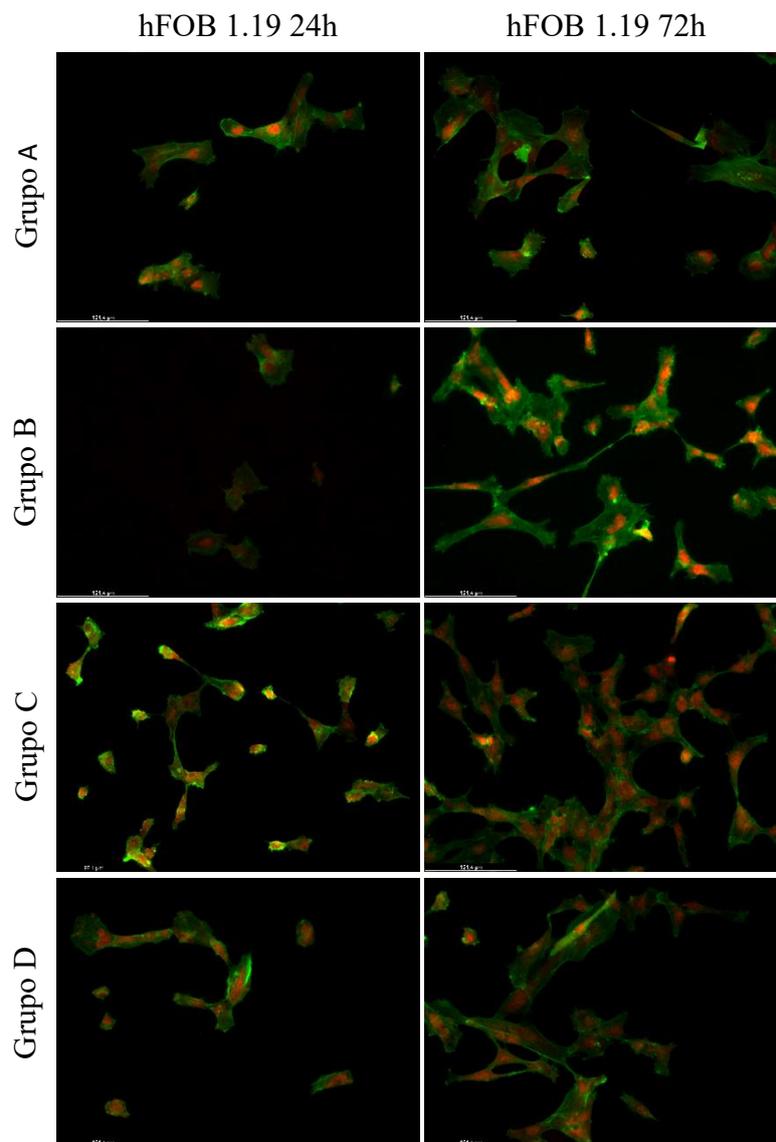


Figura 2 - Imagens de microscopia de fluorescência da superfície dos discos após 24 e 72 horas de cultura, dos grupos A, B, C e D. Ampliação de 100x. Núcleo corado a vermelho (Iodeto de propídeo) e citoesqueleto-actina corado a verde (Faloidina).

Discussão

O projeto de investigação descrito nesta dissertação tinha como objetivo estudar o comportamento *in vitro* dos hFOB 1.19 em contacto com diferentes superfícies de zircónia texturizadas a laser Nd:YAG com padrões de texturização semelhantes ao jateamento e ataque ácido. O modelo celular, os protocolos e técnicas empregues neste trabalho, encontram-se largamente validadas para o estudo do comportamento dos osteoblastos em superfícies implantares. ^(1,35,37)

Averiguou-se que não existiram diferenças na resposta celular entre os grupos texturizados a laser e os grupos de controlo, zircónia sinterizada e jateamento e ataque ácido, tendo em consideração a viabilidade e proliferação celular, a produção de Interleucina-1 β humana e de Osteocalcina humana. Contudo, verificou-se que o aumento da viabilidade celular nos grupos A, C e D apresentou um padrão similar ao longo do tempo, em comparação com o grupo B, que apesar de ter ocorrido um aumento da viabilidade nos tempos pré-definidos, este manteve-se sempre inferior relativamente aos restantes grupos. Estes resultados encontram-se consistentes com os encontrados no estudo de Rezaei N. *et al* que verificou que os discos de zircónia com rugosidade hierarquizada à meso, micro e nano-escala e discos de zircónia maquinados mostraram taxas de proliferação semelhantes, apesar de o grau de diferenciação osteoblástica nos discos com rugosidade hierarquizada ter sido superior. ⁽³⁸⁾ Uma explicação dada pelos investigadores, apoia-se na topografia de superfície, em que as estruturas nodulares à escala nanométrica podem favorecer a proliferação dos osteoblastos comparativamente à topografia típica detetada no jateamento e ataque ácido (topografia de superfície com picos afilados). O estudo de Huang Q. *et al* também demonstrou que uma sobreposição de estruturas nanométricas e micrométricas promove a adesão inicial das células, sendo que as estruturas nanométricas são as maiores influenciadoras na modulação da viabilidade e proliferação celular. ⁽³⁹⁾

As células respondem à topografia de superfície através de alterações na organização do seu citoesqueleto, na modificação da adesão celular e nas interações célula-célula. ^(14,40) Considerando as imagens de FEG-SEM, os grupos A, C e D, apresentam uma topografia de superfície idêntica, com aglomerados de cristais de zircónia, separados entre si por sulcos e vales à escala nanométrica, podendo ser a presença destas estruturas nanométricas a explicação para os valores de viabilidade celular nestes grupos ter sido superior, apesar de não estatisticamente significativos. Estes resultados sugerem que o tratamento de superfícies implantares com laser aparenta ser promissor face ao tratamento de jateamento e ataque ácido,

porém poderá ser necessário aumentar a amostra em estudo, a fim de obter resultados estatisticamente significativos. Observa-se também que os osteoblastos aderem à superfície dos discos através das extensões citoplasmáticas que se projetam, em múltiplas direções, para as estruturas nanométricas, como é possível observar pelas imagens de fluorescências e de FEG-SEM. Outro estudo que corrobora estes resultados é o estudo de Aboushelib M. *et al*, que tinha como objetivo investigar a influência de uma superfície de zircônia com nanoporos na adesão dos osteoblastos humanos. Verificaram que superfícies de titânio tratadas com jateamento e ataque ácido e de zircônia nanoporosa promoveram um maior crescimento celular, indicado pelo maior número de células aderidas aos 3 e 8 dias de cultura comparativamente com as superfícies de zircônia e de titânio polidas.⁽⁴¹⁾ Estes resultados sugerem que a nanoporosidade criada com recurso a laser em superfícies de zircônia parece ser benéfica na adesão celular.

A taxa de proliferação e diferenciação osteoblástica estão inversamente correlacionadas, significando que quando os osteoblastos apresentam uma atividade proliferativa elevada, a sua diferenciação diminui.⁽³⁸⁾ Vários estudos verificaram que, as superfícies de titânio maquinadas promovem uma maior diferenciação dos osteoblastos, acelerando o processo de formação óssea. No entanto, a massa óssea à volta dessas superfícies é menor, uma vez que a proliferação dos osteoblastos também o é.⁽⁴²⁾

Pelas razões anteriormente mencionadas, a criação de estruturas à micro e nano escala em superfícies implantares tem sido considerada uma estratégia promissora na criação de uma superfície implantar que mimetiza a estrutura hierarquizada do tecido ósseo. Existem evidências a nível celular e molecular que uma topografia hierarquizada à micro/nano escala tem a capacidade de modular a resposta celular como a adesão, proliferação e diferenciação dos osteoblastos comparativamente a uma topografia numa única escala.⁽³⁹⁾

Para além da presença de uma topografia de superfície numa escala nanométrica, a morfologia das estruturas nanométricas também desempenha um papel importante na modulação do comportamento celular. As estruturas nanonodulares (100-300nm em diâmetro) promovem a proliferação e diferenciação dos osteoblastos. Contudo, protuberâncias e tubos à escala nanométrica têm demonstrado que promovem a diferenciação dos osteoblastos apresentando um efeito inibitório sobre a sua proliferação.⁽³⁹⁾ Em suma, o comportamento celular em topografias na ordem dos micrómetros e dos nanómetros, como a adesão, crescimento e diferenciação, pode ser especificamente modulado ajustando a morfologia e a densidade das nanoestruturas.⁽³⁹⁾

Tem sido evidenciado que a rugosidade de superfície e a molhabilidade dos biomateriais afetam significativamente a resposta celular. ⁽³⁹⁾ Estudos prévios têm demonstrado que o aumento da rugosidade de superfície à escala micrométrica, em discos de titânio tratados com jateamento de partículas de óxido de alumínio (Al_2O_3) com diferentes tamanhos influencia o crescimento e o metabolismo dos osteoblastos humanos, induzindo uma taxa de proliferação superior comparativamente a superfícies lisas. No entanto, nas superfícies de zircónia, a resposta dos osteoblastos a diferentes graus de rugosidade é contraditória, tal como demonstrado neste estudo, onde se verificou que a resposta celular dos osteoblastos não diferiu entre as superfícies de zircónia com uma rugosidade média inferior a $1\mu\text{m}$ (grupo A) e as superfícies com uma rugosidade média entre 1 e $2\mu\text{m}$ (grupo B, C e D). ⁽⁴⁰⁾ Aumentar a rugosidade de superfície numa escala inferior aos micrómetros pode promover a adesão, proliferação e diferenciação celular. Adicionalmente, superfícies hidrofílicas também suscitam uma maior adesão celular inicial, proliferação, diferenciação e mineralização óssea comparativamente a superfícies hidrofóbicas. ⁽³⁹⁾

No entanto, o estudo de Huang Q. et al verificou que em três tipos de topografias com uma média de rugosidade semelhante, a superfície que apresentava valores de molhabilidade inferiores foi a que obteve melhores resultados na resposta celular. Estes resultados parecem indicar que as nanoestruturas desempenham um papel mais importante do que a rugosidade de superfície e da molhabilidade. ⁽³⁹⁾

Na literatura, tendo em consideração a média de rugosidade de superfície do titânio, superfícies com uma média inferior a $1\mu\text{m}$ são consideradas lisas e as com um valor superior a $1\mu\text{m}$ são designadas de rugosas. Uma rugosidade média entre 1 e $2\mu\text{m}$ é o considerado como ideal para as superfícies implantares, uma vez que otimizam o contacto implante-célula. ^(20,23,24)

Neste estudo, a média de rugosidade dos grupos B, C e D encontra-se no intervalo considerado o ideal, mas no grupo A essa rugosidade é consideravelmente inferior. De acordo com a literatura e tendo apenas em consideração estes resultados, seria espectável que a resposta celular no grupo A fosse inferior comparativamente aos restantes grupos, mas tal não se verificou. ^(10,20) Uma explicação para estes resultados advém de as projeções citoplasmáticas reconhecerem facilmente as nanorugosidades, e como o método de determinação da rugosidade média utilizado foi um perfilómetro de contacto, estas nanorugosidades tornaram-se indetetáveis a esta escala. Por outro lado, a deposição de proteínas do meio de cultura nos

sulcos, adsorvidas nas superfícies implantares, poderão potencialmente promover o contacto e a adesão celular. ⁽⁴⁰⁾

Assim, a rugosidade à meso-escala parece contribuir para o aumento da ancoragem do implante ao osso, através do aumento da área de contacto osso-implante, enquanto que a rugosidade à micro e nano-escala contribui para o aumento da ancoragem do implante através da aceleração e promoção da formação de osso. ⁽³⁸⁾

A osteocalcina é uma proteína da matriz celular expressa pelos pré-osteoblastos durante a fase de mineralização da matriz celular, funcionando como ligando dos iões de cálcio. ⁽²⁰⁾ Neste estudo, constatou-se que a produção de osteocalcina, entre as 24h e os 3 dias, aumentou nos grupos A, C e D e diminuiu no grupo B, apesar de as diferenças não serem estatisticamente significativas. Estes resultados atestam os obtidos pelo estudo de Rezaei N. *et al.*, em que verificaram que os valores de osteocalcina e osteopontina, marcadores tardios de mineralização óssea, foram superiores em superfícies de zircónia hierarquizada. ⁽³⁸⁾ Um outro estudo *in vitro*, cujo objetivo consistia em avaliar o comportamento dos osteoblastos em superfícies de zircónia e titânio tratadas com jateamento e ataque ácido, observou valores inferiores de osteocalcina em todas as superfícies comparativamente com os valores de osteonectina e de colagénio tipo I. ⁽²⁴⁾ Tendo em consideração estes resultados, podemos sugerir que as superfícies implantares com uma texturização à nano escala (a ser confirmada por análise perfilométrica adequada) poderão promover uma maior diferenciação dos osteoblastos comparativamente com superfícies texturizadas à micro escala.

Neste estudo *in vitro*, a citoquina pró-inflamatória avaliada foi a interleucina-1 β , verificando-se uma diminuição da concentração da mesma nos grupos A e C, entre as 24 horas e os 3 dias, e nos grupos B e D um aumento, no mesmo intervalo de tempo. No geral os valores foram reduzidos e sem diferenças estatisticamente significativas entre grupos, o que parece indiciar baixa secreção desta citocina pro-inflamatória por células osteoblásticas em contacto com as superfícies testadas. No estudo *in vivo* de Cionca N. *et al*, avaliaram, através do fluido crevicular, a expressão de várias citoquinas pró-inflamatórias entre implantes de zircónia, de titânio e em dentes. Verificaram valores de interleucina-1 β significativamente elevados nos implantes de zircónia comparativamente aos dentes. ⁽⁴³⁾ Estes resultados apresentam-se contraditórios relativamente aos obtidos neste estudo, em que a secreção da interleucina-1 β foi diminuta em todos os grupos.

Este estudo advém de uma parceria com a Unidade de Investigação em Microsistemas Eletromecânicos da Universidade do Minho onde foi realizada a caracterização das propriedades físicas e químicas dos discos. Uma limitação deste estudo é a não caracterização da rugosidade de superfície dos discos num modelo em 3D, pelas técnicas de perfilometria em 3D ou pela técnica de microscopia de força atómica (AFM), bem como a ausência de grupos de controlo em titânio, dado o facto de este material continuar a ser considerado o material de referência e o mais utilizado no fabrico de implantes dentários.

Como limitação a nível protocolar deste estudo podemos referir que sendo a osteocalcina um marcador tardio da mineralização óssea, os tempos considerados para a avaliação da mesma deveriam ter sido aos 3 e 7 dias de cultura.

Em estudos futuros, a caracterização do comportamento celular dos osteoblastos deverá ter em consideração mais parâmetros, como um maior número de marcadores de mineralização nomeadamente o colagénio tipo I e a osteopontina e a determinação da taxa de apoptose e necrose celular nos tempos pré-definidos. Será igualmente benéfico, a fixação dos discos, por exemplo com agarose, com o intuito de aumentar a estabilização dos mesmos durante todos os procedimentos laboratoriais.

Os estudos que avaliam o comportamento celular *in vitro* são predominantemente realizados com culturas celulares em 2D, não refletindo fielmente as condições *in vivo*, em que as células interagem entre si num sistema tridimensional, com zonas de heterogeneidade celular e com gradientes nutricionais e de oxigénio. Por estas razões, em estudos futuros seria interessante a utilização de modelos celulares organotípicos com culturas celulares em 3D e colonização bacteriana, a fim de reproduzir de forma mais fiel o ambiente da cavidade oral.

Conclusão

Pode-se concluir que o comportamento *in vitro* dos hFOB 1.19 parece ser equivalente entre superfícies de zircônia texturizadas a laser Nd:YAG e superfícies jateadas com partículas de alumínio e submetidas a ataque ácido. Estes resultados são promissores na possibilidade de utilização da técnica de laser Nd:YAG na texturização de superfícies implantares, transportando diversas vantagens como a criação de padrões de texturização específicos em determinada escala e a sua reprodutibilidade, a ausência do risco de contaminação nas superfícies implantares e economicamente mais acessível, quando comparado com o jateamento de partículas e ataque ácido.

Nos estudos *in vitro* as superfícies implantares tratadas com laser têm demonstrado resultados favoráveis, sendo, por isso, necessários estudos experimentais em animais e estudos clínicos para atestar estes resultados promissores.

Bibliografia

1. Kohal RJ, Bächle M, Att W, Chaar S, Altmann B, Renz A, et al. Osteoblast and bone tissue response to surface modified zirconia and titanium implant materials. *Dent Mater* [Internet]. 2013;29(7):763–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2013.04.003>
2. Schünemann FH, Galárraga-Vinueza ME, Magini R, Fredel M, Silva F, Souza JCM, et al. Zirconia surface modifications for implant dentistry. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2019;98(July 2018):1294–305. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.062>
3. Sicilia A, Cuesta S, Coma G, Arregui I, Guisasola C, Ruiz E, et al. Titanium allergy in dental implant patients: A clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(8):823–35.
4. Mesquita P, Felino A, Raposo H, Afonso A. Avaliação in vitro do comportamento de osteoblastos sobre implantes com diferentes tratamentos de superfície. *Rev Port Estomatol Med Dent e Cir Maxilofac* [Internet]. 2015;56(2):95–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpemd.2015.04.006>
5. Manzano G, Herrero LR, Montero J. Comparison of Clinical Performance of Zirconia Implants and Titanium Implants in Animal Models: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29(2):311–20.
6. Kim KT, Eo MY, Nguyen TTH, Kim SM. General review of titanium toxicity. *Int J Implant Dent*. 2019;5(1).
7. Weingart D, Steinemann S, Schilli W, Strub JR, Hellerich U, Assenmacher J, et al. Titanium deposition in regional lymph nodes after insertion of titanium screw implants in maxillofacial region. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1994;23(6 PART 2):450–2.
8. 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;856–72.
9. Quan H, Park Y-K, Kim S-K, Heo S-J, Koak J-Y, Han J-S, et al. Surface

Characterization and Human Stem Cell Behaviors of Zirconia Implant Disks Biomimetic-Treated in Simulated Body Fluid. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016;31(4):928–38.

10. Al Qahtani WMS, Schille C, Spintzyk S, Al Qahtani MSA, Engel E, Geis-Gerstorfer J, et al. Effect of surface modification of zirconia on cell adhesion, metabolic activity and proliferation of human osteoblasts. *Biomed Tech*. 2017;62(1):75–87.
11. Sivaraman K, Chopra A, Narayan AI, Balakrishnan D. Is zirconia a viable alternative to titanium for oral implant? A critical review. *J Prosthodont Res* [Internet]. 2018;62(2):121–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2017.07.003>
12. Andreiotelli M, Wenz HJ, Kohal RJ. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(SUPPL. 4):32–47.
13. 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.
14. Wei C, Gong T, Pow EHN, Botelho MG. Adhesive and oxidative response of stem cell and pre-osteoblasts on titanium and zirconia surfaces in vitro. *J Investig Clin Dent*. 2019;10(3):e12407.
15. Bächle M, Butz F, Hübner U, Bakaliniš E, Kohal RJ. Behavior of CAL72 osteoblast-like cells cultured on zirconia ceramics with different surface topographies. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(1):53–9.
16. Wenz HJ, Bartsch J, Wolfart S, Kern M. Osseointegration and clinical success of zirconia dental implants: a systematic review. *Int J Prosthodont* [Internet]. 2008;21(1):27–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18350943>
17. Nishihara H, Haro Adanez M, Att W. Current status of zirconia implants in dentistry: preclinical tests. *J Prosthodont Res* [Internet]. 2019;63(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2018.07.006>
18. Soon G, Pinguang-Murphy B, Lai KW, Akbar SA. Review of zirconia-based bioceramic: Surface modification and cellular response. *Ceram Int* [Internet]. 2016;42(11):12543–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.05.077>

19. Eduardo M de C, Pellizzer P, Moraes SLD de R, Falcón-Antenucci M, Júnior JSF. Tratamentos de superfície nos implantes dentários Surface treatments in dental implants. *Rev Cir Traumatol*. 2009;9(1):123–30.
20. von Wilmsky C, Moest T, Nkenke E, Stelzle F, Schlegel KA ndrea. Implants in bone: part I. A current overview about tissue response, surface modifications and future perspectives. *Oral Maxillofac Surg*. 2014;18(3):243–57.
21. Hao L, Lawrence J, Chian KS. Effects of CO2 laser irradiation on the surface properties of magnesia-partially stabilised zirconia (MgO-PSZ) bioceramic and the subsequent improvements in human osteoblast cell adhesion. *J Biomater Appl*. 2004;19(2):81–105.
22. Aboushelib MN, Shawky R. Osteogenesis ability of CAD/CAM porous zirconia scaffolds enriched with nano-hydroxyapatite particles. *Int J Implant Dent*. 2017;3(1).
23. Yamashita D, Machigashira M, Miyamoto M, Takeuchi H, Noguchi K, Izumi Y, et al. Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia. *Dent Mater J*. 2009;28(4):461–70.
24. Depprich R, Ommerborn M, Zipprich H, Naujoks C, Handschel J, Wiesmann HP, et al. Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head Face Med*. 2008;4(1):1–9.
25. Taniguchi Y, Kakura K, Yamamoto K, Kido H, Yamazaki J. Accelerated Osteogenic Differentiation and Bone Formation on Zirconia with Surface Grooves Created with Fiber Laser Irradiation. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016;18(5):883–94.
26. Alves-Rezende MCR, Dekon SF de C, Grandini CR, Bertoz AP de M, Claro APRA. Tratamento de superfície de implantes dentários: SBF. *Rev Odontol Araçatuba*. 2011;(May 2014):38–43.
27. Silva FL, Rodrigues F, Pamato S, Pereira JR. Tratamento de superfície em implantes dentários: uma revisão de literatura. *Rev da Fac Odontol - UPF*. 2016;21(1):136–42.
28. Gahlert M, Gudehus T, Eichhorn S, Steinhauser E, Kniha H, Erhardt W. Biomechanical and histomorphometric comparison between zirconia implants with varying surface textures and a titanium implant in the maxilla of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(5):662–8.

29. Wang Q, Zhou P, Liu S, Attarilar S, Ma RLW, Zhong Y, et al. Multi-scale surface treatments of titanium implants for rapid osseointegration: A review. *Nanomaterials*. 2020;10(6):1–27.
30. Iinuma Y, Hirota M, Hayakawa T, Ohkubo C. Surrounding tissue response to surface-treated zirconia implants. *Materials (Basel)*. 2020;13(1):30.
31. Dutta Majumdar J, Manna I. Laser processing of materials. *Sadhana - Acad Proc Eng Sci*. 2003;28(3–4):495–562.
32. Soltaninejad F, Valian A, Moezizadeh M, Khatiri M, Razaghid H, Nojehdehian H. Nd:YAG laser treatment of bioglass-coated zirconia surface and its effect on bond strength and phase transformation. *J Adhes Dent*. 2018;20(5):379–87.
33. Hao L, Lawrence J, Chian KS. Osteoblast cell adhesion on a laser modified zirconia based bioceramic. *J Mater Sci Mater Med*. 2005;16(8):719–26.
34. 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 [Internet]*. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03066-3>
35. Peñarrieta-Juanito G, Cruz M, Costa M, Miranda G, Marques J, Magini R, et al. A novel gradated zirconia implant material embedding bioactive ceramics: Osteoblast behavior and physicochemical assessment. *Materialia [Internet]*. 2018;1:3–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2018.07.002>
36. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39(2):175–91.
37. Jeon H, Simon CG, Kim G. Review Article A mini-review : Cell response to microscale , nanoscale , and hierarchical patterning of surface structure. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(7):1580–94.
38. Rezaei NM, Hasegawa M, Ishijima M, Nakhaei K, Okubo T, Taniyama T, et al. Biological and osseointegration capabilities of hierarchically (Meso-/micro-/nanoscale) roughened zirconia. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:3381–95.
39. Huang Q, Elkhooly TA, Liu X, Zhang R, Yang X, Shen Z, et al. Effects of hierarchical micro/nano-topographies on the morphology, proliferation and differentiation of

- osteoblast-like cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2016;145:37–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.031>
40. 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;27(11):e144–53.
 41. Aboushelib MN, Osman E, Jansen I, Everts V, Feilzer AJ. Influence of a Nanoporous Zirconia Implant Surface of on Cell Viability of Human Osteoblasts. *J Prosthodont.* 2013;22(3):190–5.
 42. 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.
 43. Cionca N, Hashim D, Cancela J, Giannopoulou C, Mombelli A. Pro-inflammatory cytokines at zirconia implants and teeth . A cross-sectional assessment. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2016;20(8):2285–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-016-1729-z>