



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MARCELA KIM TAKEMOTO DE ARAUJO

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO INICIAL DE *STREPTOCOCCUS*
ORALIS EM DISCOS DE TITÂNIO COM MICRO E
NANOTOPOGRAFIA: ESTUDO IN VITRO**

PIRACICABA

2019

MARCELA KIM TAKEMOTO DE ARAUJO

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO INICIAL DE *STREPTOCOCCUS*
ORALIS EM DISCOS DE TITÂNIO COM MICRO E
NANOTOPOGRAFIA: ESTUDO IN VITRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Profa. Dra. KARINA COGO MÜLLER

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELA ALUNAMARCELA KIM TAKEMOTO DE ARAUJO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. KARINA COGO MÜLLER

PIRACICABA

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Ar15a Araujo, Marcela Kim Takemoto de, 1996-
Avaliação da adesão inicial de *Streptococcus oralis* em discos de titânio com micro e nanotopografia : estudo in vitro / Marcela Kim Takemoto de Araujo. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Karina Cogo Müller.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Biofilmes. 2. Implantes dentários. 3. *Streptococcus oralis*. I. Cogo, Karina, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Biofilms

Dental implants

Streptococcus oralis

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 01-10-2019

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que financiou o presente estudo (processo nº 443837/2014-7).

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e forças para a conclusão deste trabalho.

A Faculdade de odontologia de Piracicaba, seu corpo docente e administração pelo crescimento e evolução como pessoa e profissional.

A minha orientadora Dra Karina Cogo Müller pelo suporte, incentivos, empenho e correções.

Ao Daniel C. H. Chan pelo trabalho em equipe e todo o suporte.

Aos meus pais por todo amor e incentivo emocional.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, muito obrigada.

RESUMO

Para melhorar a osseointegração e integração com tecidos moles, as superfícies dos implantes vêm sendo modificadas. No entanto, ainda não está claro se, alterações topográficas nessas superfícies alteram colonização bacteriana. Dessa forma, presente estudo comparou adesão de *Streptococcus oralis* em diferentes superfícies de titânio (Ti), usinada, micro e nanotopográficas. Discos de titânio foram submetidos a diferentes métodos para a obtenção de superfícies: usinada (A), micro (B) e nanotopografia (C) e sujeitos à ensaio de adesão à superfície de Ti por *Streptococcus oralis*, um colonizador inicial do biofilme bucal. Para avaliação da formação inicial de biofilme, discos de Ti com película adquirida formada por saliva humana foram colocados verticalmente em placas de 24 poços contendo meio BHI modificado, incubando-se por 24 h a 37 °C, em 5% de CO₂. Após esse período, a adesão foi avaliada por contagem de colônias, por análise de polissacarídeos de matriz extracelular e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados foram comparados utilizando ANOVA e Tukey. Em todos os grupos experimentais houve adesão bacteriana, porém, com sem formação de polissacarídeos de matriz extracelular. Os valores de média e desvio padrão para a contagem de colônias foram (em ufc/mL, média e desvio padrão): Grupo A - $1,64 \times 10^6$ ($4,10 \times 10^5$), Grupo B- $1,96 \times 10^6$ ($4,61 \times 10^5$) e Grupo C $1,56 \times 10^6$ ($6,23 \times 10^5$). Todas as superfícies apresentaram resultados semelhantes em relação à quantidade de células bacterianas aderidas aos discos. As imagens do MEV mostraram uma adesão inicial de *S. oralis*, corroborando os resultados de quantificação bacteriana. O presente estudo demonstrou que as superfícies micro e nanotopografia não alteram a adesão da *S. oralis* em relação à superfície usinada nos discos de titânio.

Palavras-chave: Biofilme. Implante. *Streptococcus oralis*.

ABSTRACT

Implant surfaces have been modified to improve osseointegration and soft tissue integration. However, it is not clear whether topographic changes on these surfaces interfere with bacterial colonization. Thus, the present study compared the *Streptococcus oralis* adhesion on machined, micro and nanotopographic titanium surfaces. Titanium discs were subjected to various surface treatments and were classified as: machined (A), micro (B) and nanotopography (C), and subjected to *Streptococcus oralis* adhesion, a primary colonizer of the oral biofilm. For evaluation of the initial biofilm formation, human saliva coated Ti discs were placed vertically in 24-well plates containing modified BHI medium and incubated for 24 h at 37 ° C, in 5%CO₂. After this period, adhesion was assessed by colony counting, extracellular matrix polysaccharide analysis and scanning electron microscopy (SEM). Data were compared using ANOVA and Tukey. In all experimental groups there was bacterial adhesion, however, with no extracellular matrix polysaccharides. The mean and standard deviation values for colony count were (in cfu / mL, mean and standard deviation): Group A - 1.64x10⁶ (4.10x10⁵), Group B- 1.96x10⁶ (4.61x10⁵) and Group C 1.56x10⁶ (6.23x10⁵). All surfaces showed similar results regarding the number of bacterial cells adhered to the discs. SEM images showed an initial adhesion of *S. oralis*, corroborating the results of bacterial quantification. In conclusion, the present study demonstrated that the micro and nanotopography surfaces do not alter the adhesion of *S. oralis* in relation to the machined surface in the titanium disks.

Key words: Biofilm. Implant. *Streptococcus oralis*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Tratamentos de superfície e interferência na colonização bacteriana	13
2.2 <i>Streptococcus oralis</i>	17
3 PROPOSIÇÃO	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Obtenção dos discos de titânio e caracterização da superfície	22
4.2 Estudo	22
4.2.1 Micro-organismos utilizados e condições de cultivo	22
4.2.2 Meio de cultura e condições de crescimento	23
4.2.3 Reativação da bactéria	23
4.2.4 Coleta e tratamento da saliva	23
4.2.5 Preparo da solução de saliva	23
4.2.6 Formação da película sobre os discos de HÁ	24
4.2.7 Preparo do inóculo	24
4.2.8 Preparo das placas de 24 poços	24
4.2.9 Remoções do biofilme do corpo de prova	24
4.2.10 Diluições	25
4.2.11 Plaqueamento	25
4.2.12 Contagem de colônias	25

4.2.13 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	25
4.2.14 Extração de matriz extracelular de biofilme	26
4.2.15 Quantificação de Polissacarídeos na matriz extracelular do biofilme	26
5 RESULTADOS	28
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	38
Anexo 1 –Verificação de originalidade e prevenção de plágio	38
Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa	39
Anexo 3 – Iniciação Científica	40

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço da tecnologia, a odontologia tem sido contemplada com o desenvolvimento de novos materiais e descobertas científicas. A introdução dos implantes dentários como método terapêutico para repor dentes perdidos provavelmente foi a maior evolução da odontologia nestas últimas décadas, apresentando um alto nível de sucesso (Attia et al., 2019, Annunziata e Guida, 2015).

Atualmente, os implantes dentários representam uma opção de tratamento confiável na reabilitação oral de pacientes desdentados parciais ou totais, a fim de garantir vários tipos de próteses. Os implantes dentários tornaram-se um procedimento padrão para a substituição de um dente na zona estética, oferecendo muitas vantagens (Smeets et al., 2016). Com relação à sua introdução no final da década de 1960, as indicações clínicas para terapia com implantes foram significativamente ampliadas e resultados ótimos foram alcançados, mesmo em condições clínicas anteriormente consideradas desfavoráveis. Tal evolução deve muito ao progresso significativo feito no campo de superfícies de titânio. A modificação topográfica e química das superfícies tradicionais de titânio levou a uma verdadeira mudança de época na odontologia de implantes (Annunziata e Guida, 2015).

Branemark et al. descreveu pela primeira vez o processo de osseointegração há mais de 45 anos. Seu trabalho lançou uma nova era de pesquisa sobre formas e materiais de implantes dentários (Smeets et al., 2016). Apresentado por Branemark et al., em 1977, os primeiros implantes apresentavam-se com superfície lisa (usinada) (Branemark et al., 1977). Em busca de melhorias técnicas, muitos fabricantes modificaram esta superfície, alterando sua rugosidade. As modificações nas superfícies dos implantes promovem, de forma geral, aumento da rugosidade e da topografia, que podem ser observadas em escalas milimétricas, micrométricas e nanométricas (Schwartz-Filho et al., 2011).

A modificação topográfica e química das superfícies tradicionais de titânio levou a uma verdadeira mudança de época na odontologia de implantes. Dependendo do tipo e das características do tratamento de superfície aplicado, uma ampla gama de implantes foi produzida, o que contribuiu para o sucesso dessa técnica (Annunziata e Guida, 2015). Essas modificações nas superfícies dos implantes, comprovadamente aumentam a área de contato com o osso, aumentando a osseointegração, quando comparadas com superfícies lisas (Wennerberg et al., 1996, Lang e Jepsen, 2009, Wennerberg e Albrektsson 2010), inclusive em superfícies com nanotopografia (Pachauri et al., 2014). No entanto, ainda é pouco explorada a relação entre a presença de nanoestruturas na superfície do implante e a adesão/formação de biofilme bacteriana (Jäger et al. 2017).

A instalação de um processo inflamatório-infeccioso pode ocorrer nas regiões peri-implantares, como a mucosite, que atinge a mucosa na região do implante e a peri-implantite, que acomete a mucosa e o osso de suporte ao implante, levando muitas vezes à perda do implante. Em uma revisão sistemática abrangendo nove estudos, 1497 pacientes e um acompanhamento mínimo de cinco anos, encontrou uma prevalência média de peri-implantite em 9,6% dos implantes e 18,8% dos pacientes (Atieh et al., 2013). Em um estudo retrospectivo de 10 anos, a prevalência de mucosite foi de 8,7% e a de peri-implantite de 6,8% (Cavalli et al., 2015).

Ainda não há um consenso se as características da superfície do implante, como rugosidade, topografia, energia livre de superfície, entre outros, tenham um significativo efeito na adesão bacteriana e possivelmente na iniciação da peri-implantite (Renvert et al., 2011). Porém trabalhos recentes tiveram como objetivo examinar *in vivo* a adesão bacteriana inicial em implantes de titânio com diferentes tratamentos de superfície. Alguns trabalhos (Quirynen and Bollen, 1995, Rimondini et al., 1997, Subramani et al., 2009, Burgers et al., 2010) demonstraram uma relação direta entre quantidade de biofilme e grau de rugosidade da superfície de titânio. Quirynen & Bollen em 1995, através de revisão de literatura de estudos *in vitro* e estudos *in vivo*, analisaram a influência da rugosidade superficial do implante, concluindo que para o biofilme supragengival, estes são os fatores que mais favorecem a formação do biofilme bacteriano. Devido a este fator a procura por superfície com menor rugosidade proporciona menos adesão bacteriana (Quirynen and Bollen, 1995).

Rimondini et al., em 1997 analisou *in vivo* a rugosidade da superfície necessária para reduzir a colonização da placa em titânio após 24 horas. Concluiu que uma superfície de titânio com $R_a \leq 0,088$ microns e $R_z \leq 1,027$ microns inibe fortemente o acúmulo e a maturação da placa no período de 24 horas (Rimondini et al., 1997).

Uma conclusão semelhante foi encontrada por Subramani et al., em 2009. O objetivo foi revisar a literatura em relação à formação de biofilme em implantes dentários e a influência das características da superfície (química, energia livre de superfície e rugosidade) dos materiais para implantes e pilares dentais e suas características de design na formação de biofilme e suas propriedades. O aumento da rugosidade da superfície e da energia livre da superfície facilita a formação de biofilme nas superfícies dos implantes e pilares dentários, embora essa conclusão seja derivada da literatura amplamente descritiva. A química da superfície e os recursos de design da configuração implante-pilar também desempenham um papel significativo na formação de biofilme.

Outro estudo chegou à conclusão de que a adesão de bactérias à variados tipos de superfícies de titânio é primariamente influenciada pela rugosidade superficial, ficando a energia livre de superfície em segundo plano (Burgers, Gerlach et al., 2010). No entanto, outro estudo encontrou que a rugosidade e a microtopografia não estimularam a formação inicial de biofilme em superfícies de titânio com diferentes tratamentos de superfície (Ferreira-Ribeiro et al., 2016).

Atualmente superfícies de titânio com escalas micro e nanométrica foram estudadas a fim de analisar o processo de osteogênese. Nestes estudos, a superfície com nanotopografia foi comparada às superfícies com microtopografia e superfícies usinadas (lisas). Este estudo teve como objetivo observar o efeito morfológico e molecular da laminina-1 em superfícies de implantes nanoestruturados em um modelo de coelho. Após 2 semanas de cicatrização, os implantes foram removidos e submetidos a análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de expressão gênica. A superfície revestida com proteína mostrou maior expressão gênica dos genes típicos envolvidos na cascata de osseointegração do que a superfície de controle. Os implantes nanoestruturados foram revestidos com laminina-1 (teste; diluição, 100 µg / mL) e inseridos nas tíbias de coelho. Implantes não revestidos foram utilizados como controle. (Schwartz-Filho et al., 2012).

Ainda, nesses mesmos estudos, foi caracterizada fisicamente e quimicamente essas superfícies e foi verificado que a superfície com nanotopografia tem menor rugosidade que a superfície com microtopografia, e maior rugosidade que a superfície usinada.

A nanotecnologia tem recebido grande atenção na mídia pública e científica. Para que um material, partícula ou superfície receba a denominação “nano”, o mesmo deve estar na escala entre 1 a 100 nm. As alterações na nanotopografia transmitem seus efeitos nos níveis físico, químico e biológico, resultando em maior adesão das células osteogênicas, assim, potencialmente promovendo a osseointegração (Smeets et al., 2016).

Analizando os ótimos resultados em relação à osseointegração e osteogênese da superfície com nanotopografia, é necessário investigar mais a fundo essa superfície com características promissoras. Ainda não há relatos na literatura de como ocorre a adesão microbiana e a formação de biofilme nessa superfície, em especial de *Streptococcus oralis*, um colonizador inicial do biofilme. Sendo assim, é necessário conhecer o perfil de colonização bacteriana nas superfícies com nanotopografia em comparação com as superfícies lisas e micro-estruturadas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi comparar a

formação de biofilme de *S. oralis* entre três superfícies de titânio: superfície usinada, superfície micrometricamente rugosa e superfície nanometricamente rugosa, em estudo *in vitro*.

O presente projeto foi financiado na forma de Auxílio Pesquisa (Edital Universal CNPq - 443837/2014-7).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tratamentos de superfície e interferência na colonização bacteriana

Os implantes estão se tornando a primeira escolha de reabilitação para a perda de dentes. Mesmo tendo uma alta taxa de sucesso, as falhas ainda ocorrem e um dos motivos é o aumento das infecções causadas por biofilme (Kang et al., 2019). O uso de implantes dentários de titânio tem mudado a maneira de reabilitar pacientes na odontologia moderna e pode contar com altas taxas de sobrevivência e sucesso a longo prazo (Annunziata e Guida, 2015).

Em geral, as taxas de sobrevida a longo prazo dos implantes dentários são excelentes. No entanto, falhas no implante ainda ocorrem em uma pequena quantidade de pacientes. O grande desafio para os implantologistas contemporâneos é proporcionar reabilitação oral a pacientes com condições ósseas saudáveis, solicitando protocolos de carregamento rápido ou a pacientes com ossos comprometidos quantitativa ou qualitativamente. Essas condições de carregamento exigem avanços no desenho da superfície do implante. A elucidação da fisiologia da cicatrização óssea levou os pesquisadores a projetar superfícies de implantes que imitam de perto as características naturais dos ossos (Smeets R et al., 2016).

A topografia do implante dentário pode ser classificada em macro, micro e nanoescala. A macrotopografia de um implante é determinada por sua geometria visível, por exemplo, roscas e design cônico. A escala métrica é de milímetros a micrômetro. Nos últimos anos, o esforço científico se concentrou principalmente na micro e nanogeometria. No entanto, a macrogeometria apropriada combinada com a preparação adequada dos furos para implantes é a base fundamental do sucesso clínico na implantologia dentária (Smeets et al., 2016).

A osseointegração de implantes dentários foi previamente caracterizada como uma conexão estrutural e funcional entre o osso recém-formado e a superfície do implante (Smeets et al., 2016). A união estrutural e funcional do implante com osso vivo é grandemente influenciada pelas propriedades da superfície do implante. O sucesso de um implante dentário depende das características químicas, físicas, mecânicas e topográficas de sua superfície. A influência da topografia da superfície na osseointegração se traduz em tempos de cicatrização mais curtos, da colocação do implante à restauração (Ogle, 2014). Grandes avanços foram feitos no desenvolvimento de novas superfícies de implantes dentários. Essas inovações contribuem para a reabilitação de pacientes com alto sucesso e taxas de sobrevivência previsíveis, mesmo em condições desafiadoras. As modificações de

superfície promovem alterações à topografia, à hidrofiliicidade e ao revestimento externo dos implantes dentários, a fim de melhorar a osseointegração em ossos saudáveis e comprometidos (Smeets et al., 2016)

Além da topografia e da rugosidade, a molhabilidade superficial ou a hidrofiliicidade dos implantes é outro aspecto central da osseointegração. Essa propriedade química é expressa pelo ângulo de contato com a água que varia de 0 ° em superfícies muito hidrofílicas a mais de 90 ° em superfícies hidrofóbicas. A capacidade das células de se ligarem e migrarem na superfície do implante é impulsionado pela adsorção de proteínas. (Smeets et al., 2016). Os ângulos de contato das preparações da superfície do implante dentário influenciam a molhabilidade e a adesão do tecido (Mekayarajjananonth e Winkler, 1999).

As modificações da microtopografia dos implantes está ligada à microdureza em uma escala de micrômetro (1–100 µm) e é modificada por técnicas de fabricação como usinagem, condicionamento ácido, anodização, jateamento de areia, jateamento e procedimentos diferentes de revestimento (Smeets et al., 2016). As modificações da microtopografia contribuem para um aumento na área da superfície.

A macrodureza da superfície do SLA (*Sandblasted and acid-etched*, jato de areia, grão grande, condicionada por ácido) é fabricada por jato de areia de grão grande com partículas de corindo de 0,25 a 0,5 mm a 5 bar. A estrutura da superfície microtopográfica é o resultado de um processo subsequente de condicionamento ácido com HCl / H₂SO₄ à altas temperaturas, gerando uma área de superfície ativa com rugosidade igual e adesão celular aprimorada (Smeets et al., 2016). O processo de jateamento de areia também aprimora as características biomecânicas dos implantes com ácido.

A nanotecnologia tem recebido grande atenção em público e na ciência. Pensa-se que a nanotopografia de implantes dentários influencie as interações célula-implante no nível celular e proteico (Smeets et al., 2016). Um aumento na energia da superfície não é meramente resultado de alterações na rugosidade da superfície, mas é em grande parte causado por alterações da química da superfície.

A perspectiva futura nos revestimentos da superfície dos implantes é afim de enfrentar os desafios das indicações avançadas em implantologia dentária, atualmente há um enorme esforço científico focado em revestimentos bioativos de superfície. Essas abordagens inovadoras pretendem imitar o ambiente bioquímico e a arquitetura nanoestrutural do osso humano (Smeets et al., 2016).

O objetivo principal da pesquisa biomédica em modificações de superfície é facilitar a osseointegração precoce e garantir um contato osso-implante em longo prazo sem perda óssea marginal substancial. O foco central do desenvolvimento do implante é minimizar a adesão bacteriana, promovendo o recrutamento, a adesão e a proliferação de células osteogênicas(Smeets et al., 2016).

Há uma enorme quantidade de métodos para modificações das superfícies dos implantes. Porém, ainda não está claro qual o tipo de modificação é a melhor. Vários tratamentos não só a topografia é modificada, mas também a química da superfície, da mesma maneira como as alterações químicas também podem alterar a topografia. Os Tratamentos físicos incluem o jateamento abrasivo, Irradiação ultravioleta de superfícies cristalinas de TiO₂ e ablação a laser. O processo de jateamento forma varias superfícies com diferentes rugosidades e características químicas. Já a irradiação ultravioleta de superfícies cristalinas de TiO₂ desenvolve uma superfície com aspectos hidrofílica e anfifílica. A ablação forma uma fina camada de óxido que favorece propriedades como a dureza e a resistência à corrosão. Os tratamentos eletroquímicos como a oxidação anódica altera a topografia da superfície e sua química. Superfícies anodizadas adquirem poros irregulares. Tratamentos químicos como o condicionamento ácido, condicionam uma superfície, removendo a camada superficial do material criando superfícies com diferentes características. A superfície obtida influencia a osteogênese, gera nanoestruturas. Tratamentos de deposição com implantação de íons envolvem uma fonte iônica, um acelerador e uma câmara onde a superfície é posicionada. Outro tratamento de deposição é o sol-gel que é usada para obtenção de nanotopografia. Várias técnicas para alteração das estruturas podem ser usadas. A microtopografia estimula uma forte integração óssea. Nanotopografia possui uma grande importância na integração óssea com os implantes. Nanoestruturas promovem a adsorção de proteínas à superfície podendo influenciar os estágios iniciais da formação óssea. Outros tratamentos químicos incorporam diversos íons, como os de fósforo, magnésio que aumenta a nucleação de hidroxiapatita e apatita sobre o titânio. O cálcio acelera a adsorção de íons fosfato e aumenta a habilidade do titânio de induzir a formação de minerais cálcio e fosfato nas superfícies. O fosfato é importante para estabelecer o recobrimento de uma superfície. As moléculas/proteínas biofuncionais mostram um aumento da osteogênese. Os bifosfonatos têm mostrado aumento na resposta óssea. E o flúor nos implantes aumenta a densidade óssea (Schwartz-Filho, 2011).

Muitos estudos vêm sendo realizados, a fim de avaliar as diferentes superfícies dos implantes e a influência em relação à menor ou maior adesão do biofilme oral (Schmidlin et al., 2013, Schwartz-Filho, et al. 2012, Al-Ahmad et al., 2013).

A falha primária do implante devido à osseointegração insuficiente ocorre em 1-2% dos pacientes nos primeiros meses. A falha secundária do implante se desenvolve vários anos após a osseointegração bem-sucedida em cerca de 5% dos pacientes e geralmente é causada por peri-implantite (Smeets et al., 2016). Os implantes dentários e seus componentes protéticos são propensos à colonização bacteriana e formação de biofilme (Silva et al., 2018). A formação de biofilme em implantes ocorre por conta do tipo de superfície e proteínas de adesão produzidas por um microrganismo, em conjunto aos fatores locais e sistêmicos (Mombelli e Décaillot, 2011).

Nas superfícies das mucosas, o mecanismo de eliminação que ocorre durante a renovação epitelial oral é um meio natural eficaz de reduzir a adesão microbiana. Mas esse fenômeno protetor não ocorre na superfície dos implantes, onde o biofilme dental pode se acumular na fenda peri-implantar e permanecer em contato com o epitélio gengival, podendo causar a peri-implantite que é uma das principais doenças bucais com as quais temos de lidar na prática periodontal. É uma doença inflamatória polimicrobiana que leva à destruição do tecido que suporta o implante. Sem tratamento, ela resulta na perda do implante (Lasserre et al., 2018)

A epidemiologia da peri-implantite, é menos bem estudada em comparação à das doenças periodontais devido ao desenvolvimento relativamente recente dessa doença (Lasserre et al., 2018).

Dois importantes estudos transversais suecos avaliaram a prevalência de peri-implantite em implantes Brånemark System® com um tempo de função documentado de pelo menos 5 anos. Os valores registrados de peri-implantite foram 28% e 16% para os pacientes estudados. (Lasserre et al., 2018).

O controle da infecção inclui a eliminação do biofilme da superfície do implante e desbridamento mecânico eficiente. No entanto, a supra-estrutura protética e as características da superfície do implante podem complicar o tratamento. As evidências mostram que, quando adequadamente gerenciadas, a mucosite peri-implantar é reversível. Após o tratamento, manutenção regular e boa higiene bucal são essenciais para um resultado previsível e estabilidade a longo prazo (Renvert et al., 2018).

Outro trabalho utilizou a porção transmucosa dos implantes com diferentes superfícies, uma delas consistia em uma superfície condicionada com ácido (tipo A), uma superfície usinada com uma ranhura circunferencial (tipo C) e uma superfície preparada por oxidação anódica leve (tipo D). O controle era uma superfície usinada padrão (tipo B). Infiltrados inflamatórios foram associados a todas as superfícies do implante e foram

comumente encontrados subepiteliale perivascular. A análise estatística mostrou que a superfície do tipo C (superfície usinada com uma ranhura) apresentava infiltrados inflamatórios significativamente maiores que a superfície do tipo B (superfície usinada sem ranhura; $P < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação ao tamanho dos infiltrados inflamatórios ou em termos da natureza das células infiltrantes. Esses resultados sugerem que o desenvolvimento de inflamação associada aos implantes é independente do tipo de superfície, mas está associado à presença de placa. As diferentes superfícies não influenciaram a natureza do infiltrado, sendo as células T o tipo de célula predominante em todas as lesões. Finalmente, os diferentes tipos de superfície do implante pareciam não influenciar a microbiota peri-implantar. No entanto, a presença do sulco circunferencial tendia a estar associada a infiltrados maiores. Ainda não foi determinado se isso se deve ao aumento da acumulação de placas (Pongnarisorn et al., 2007).

A colonização da área peri-implantar submucosa começa imediatamente após a instalação do implante ou do pilar. Em pacientes desdentados, os estreptococos anaeróbicos facultativos dominam inicialmente, seguidos por bastonetes facultativamente anaeróbicos e bastonetes anaeróbios estritos gram-negativos, como as espécies *Fusobacterium* e *Prevotella*. Essas bactérias do complexo vermelho também foram detectadas em um número significativo de peri-implantes (Stokman et al., 2017).

2.2 *Streptococcus oralis*

Streptococcus oralis é um membro da microbiota oral humana normal, capaz de patogenicidade oportunista (Do et al., 2009). *S. oralis* é um membro numericamente importante da microbiota oral comensal, isolado de todas as superfícies intra-orais e um organismo pioneiro envolvido na colonização primária da dentição (Nyvad e Kilian, 1990). As bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* são os primeiros habitantes da cavidade oral que podem ser adquiridas logo após o nascimento e, portanto, desempenham um papel importante na montagem da microbiota oral (Abranches et al., 2018)

Esse micro-organismo foi implicado como um potencial organismo causador de doenças cardiovasculares humanas, incluindo endocardite infecciosa e aterosclerose. E espécie possui polissacarídeos de receptor de coagregação (RPS) na parede celular, que funcionam como receptores de adesinas de superfície em outros membros da comunidade de biofilme oral. *S. oralis* possui a capacidade de induzir através do RPS respostas inflamatórias em células endoteliais da aorta humana (HAECs). (de Toledo et al., 2012).

A cavidade oral humana hospeda uma microbiota complexa composto por bactérias, fungos e vírus. Essas bactérias são responsáveis por duas doenças comuns da boca humana (Mosaddad et al., 2019). A comunidade microbiana formada por essa microbiota é chamada de biofilme, está associada à superfície do dente, ou a qualquer outro material duro não descamativo (Characklis et al., 1989).

O desenvolvimento do biofilme oral requer uma série complexa de interações entre os tecidos hospedeiros e as bactérias colonizadoras, bem como inúmeras interações entre espécies do próprio organismo (Sztukowska et al., 2019). Os meios de formação do biofilme são divididos em três fases principais de desenvolvimento, fase de aderência inicial, fase de acúmulo e fase da comunidade. Como já citado *S. oralis* é um colonizador primário, ele se apresenta na fase de adesão inicial, onde envolve mecanismos inespecíficos e específicos de adesão à película adquirida do esmalte e outras superfícies dentárias expostas. Ele possui maior capacidade de se aderir aos dentes nas fases iniciais de formação do biofilme (Graner et al., 2005)

Como importantes colonizadores primários da boca, os estreptococos orais possuem múltiplas adesinas de alta afinidade que mediam a ligação inicial às superfícies dos dentes por meio de interações com substratos na película salivar adquirida, incluindo albumina, proteínas ricas em prolina, glicoproteínas, mucinas e ácido siálico. Polissacarídeos bacterianos extracelulares, bem como DNA extracelular são constituintes principais das matrizes de biofilme de placas cuja produção é desencadeada por adesão bacteriana. A amilase salivar também parece ter um papel importante na colonização de superfícies orais de mamíferos a partir de bactérias de ligação à amilase. Colonizadores tardios, Gram-positivos e Gram-negativos, interagem com os estreptococos através de uma série de eventos co-agregação e deco-adesão até que uma placa madura seja alcançada. Uma vez estabelecida, a comunidade do biofilme ela se torna relativamente estável possuindo diferentes espécies na comunidade em homeostase. Como mencionado anteriormente, *Streptococos* são colonizadores precoces da cavidade oral e desempenham papéis fundamentais na moderação acidificação do biofilme, gerando, entre outras coisas, grandes quantidades de álcalis substratos salivares e alimentares (Abranches et al., 2018).

Na cavidade oral, o biofilme é formado sobre uma camada de proteína chamada de película, que é formada por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e componentes do fluído gengival. A formação do biofilme na boca pode ser dividida em várias etapas, a primeira fase a formação da película e finalizando com a formação da placa madura (Fejerskov e Kidd, 2005; Thylstrup e Fejerskov, 2001).

Atualmente, acredita-se que a maioria das infecções, particularmente crônicas com exacerbações, seja resultado da formação de biofilme principalmente na presença de biomateriais. Deve-se enfatizar que a penetração de antibióticos e outros agentes antimicrobianos nas camadas mais profundas de um biofilme é dificultada, causando ineficácia terapêutica. Os biofilmes desempenham um papel crescente na odontologia como resultado do uso cada vez mais amplo na prática odontológica de materiais implantáveis. Os biofilmes são produzidos na superfície dos dentes como placa dentária, nos seios paranasais, nas próteses e nos implantes dentários, constituindo um risco particular para pacientes severamente imunocomprometidos (Wróblewska et al., 2015)

Muitos estudos já mostraram a presença de *S. oralis* como colonizadora inicial em amostras peri-implantares, ou relacionadas a implantes dentários (Bermejo et al., 2019, Sánchez et al., 2015, Ferreira Ribeiro et al., 2016, Doll et al., 2019)

Para combater infecções associadas a implantes, há necessidade de novos materiais que inibam efetivamente a formação de biofilme bacteriano. Num estudo anterior,

as propriedades anti-adesivas da funcionalização da superfície de titânio com base no princípio "superfícies porosas com infusão de líquido escorregadio" (SLIPS) foram demonstradas e o mecanismo subjacente foi analisado. Com taxas de fluxo crescentes, a superfície exibiu uma redução significativa no biofilme anexado do colonizador inicial oral *Streptococcus oralis* e de um biofilme oral de várias espécies composto por *S. oralis*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella dispar* e *Porphyromonas gingivalis*. Portanto, pode-se concluir que a capacidade do titânio com infusão de líquido de repelir os biofilmes de *S. oralis* deve-se principalmente ao enfraquecimento da adesão bacteriana à interface líquida subjacente (Doll et al., 2019).

Estudos sobre a microbiota em torno de implantes dentários demonstraram que, quando as bactérias colonizam a fenda peri-implantar após a colocação do implante, as espécies dominantes são do gênero *Streptococcus* e os membros dos complexos amarelo e roxo, como *Actinomyces* spp., desenvolvendo a comunidade microbiológica. Da mesma forma, os microrganismos associados à superfície do implante em a presença de tecidos peri-implantares saudáveis são predominantemente cocos e bastonetes Gram-positivos. À medida que o biofilme amadurece, os membros dos complexos vermelho, laranja e verde colonizam. As situações clínicas associadas à falha de implantes ou doenças peri-implantares, existe predomínio de uma ou mais espécies complexas (Sánchez et al., 2015).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi de comparar a adesão inicial de *Streptococcus oralis* entre três superfícies de titânio: superfície usinada, superfície com microtopografia e superfície com nanotopografia em estudo in vitro.

4 MATERIAL E MÉTODOS.

4.1 Aquisição dos discos de titânio e caracterização da superfície

Os discos de titânio (10 mm x 2 mm) utilizadas nesse projeto foram produzidas e fornecidas pela empresa NEODENT (Curitiba, Paraná, Brasil). Três tipos de superfície de titânio foram estudadas: G1 – usinada; G2- microtopografia e G3 – nanotopografia. Os discos com microtopografia foram caracterizados em um processo de jateamento com partículas de óxido de alumínio, seguido de um procedimento de condicionamento ácido. Volumes idênticos de solução de H_2SO_4 e de H_2O_2 30% foram utilizados para obter a superfície com nanotopografia (Nanci, Wuest et al. 1998). O disco com maior grau de rugosidade foi o de microtopografia (Schwartz et al., 2012). O trabalho previamente conduzido por um dos colaboradores do presente estudo (prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho, professor do curso de mestrado em Implantodontia da UNISA) já estudou a caracterização da rugosidade, química e morfologia desses discos de titânio.

A topografia dos discos foi feita no nível micrométrico usando interferômetro óptico (MicroXam; ADE Phase Shift Technology Inc., Tucson, EUA) e microscopia de força atômica (Dimension 3000 SPMTM, Digital Instruments, Santa Barbara, EUA) avaliação da escala manométrica, Microscopia eletrônica de varredura (LEO 440 – Zeiss, Oberkochen, Alemanha) foi usada para a avaliação da morfologia das superfícies. E avaliação da química de superfície foi feita pela espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDX; LEO 440). Os resultados estão publicados no artigo: Schwartz-Filho HO, et al. Titanium surfaces with nanotopography modulate cytokine production in cultured human gingival fibroblasts. J Biomed Mater Res A. 2012 Oct;100(10):2629-36.

4.2 Estudo

4.2.1 Micro-organismos utilizados e condições de cultivo

Para esse estudo foi utilizada a espécie bacteriana *Streptococcus oralis* ATCC 35037. Essa cepa foi rotineiramente cultivada em caldo BHI (Brain Heart Infusion - DifcoCo, Detroit, MI, USA) ou em BHI ágar (Difco). O crescimento foi feito em atmosfera de 10% CO_2 , à 37°C.

4.2.2 Meio de cultura e condições de crescimento.

Foi utilizada para os estudos a bactéria *S. oralis* ATCC 35037. O crescimento e cultivo foram feitos em estufa de 5% de CO₂, à 37 °C. As culturas de *S. oralis* foram feitas com meio BHI ágar. O meio de cultura para a formação do biofilme é composto de caldo Brain Heart Infusion (BHI) 37g/L, Mucina 2,5g/L, NaHCO₃ 2g/L, Extrato de levedura g/L, Hemina 5µg/mL, Menadiona 5µg/mL e Cisteína 0,1g/mL.

4.2.3 Reativação da bactéria

Com todos os materiais já separados, adesão da *S.oralis* iniciou-se com a reativação de cultura de *S. oralis* em placa com meio BHI ágar. A cultura foi incubada por 18 – 24 h em 5% CO₂, a 37 °C.

4.2.4 Coleta e tratamento da saliva

Para a formação de biofilme, foi utilizada saliva humana estéril. Esse estudo teve aprovação do comitê de ética em humanos da FOP-UNICAMP, PROTOCOLO 56790616.4.0000.5418

A coleta de saliva foi realizada sempre pelo período da manhã. O doador usou creme dental contendo somente fluoreto de sódio na noite anterior e no dia da coleta da saliva; não usou soluções para bochecho e estava em jejum. Para auxílio na coleta mascarou filme de parafina para estimulação da saliva, descartou os primeiros 5 mL e coletou cerca de 35 mL em tubo esterilizado e armazenado no gelo.

4.2.5 Preparo da solução de saliva

Na saliva foi acrescentada numa proporção de 1:100 PMSF 0,1M e numa proporção de 1:1 (v/v) solução AB (KCl 50 mM, KHPO 4 1 mM, CaCl 2 1 mM, MgCl 2 0,1 mM). Essa mistura foi centrifugada 10 min, à 4 ° C, 3800 g. Coletou-se o sobrenadante e filtrou pelo filtro 0,22 µm à vácuo para esterilização da saliva.

4.2.6 Formação da película sobre os discos de HA

Os discos previamente esterilizados e ancorados em aparatos metálicos na posição vertical foram colocados na placa de 24 poços. Em cada poço foi pipetado 3 mL da solução de saliva já filtrada deixando os discos totalmente submersos na saliva. Eles foram incubados na orbital shaker a 37 °C, por 2 h a 60 rpm. Os discos foram removidos da solução de saliva, onde foi formada a película adquirida, ficando prontos para serem utilizados para o experimento de formação do biofilme.

4.2.7 Preparo do inóculo

Com uma alça metálica, previamente aquecida a rubro, foram coletadas duas a três colônias de *S. oralis* crescidas em meio BHI ágar por 18 a 24 h. Colocamos essas colônias em tubo de vidro contendo 9 mL de BHI modificado sem mucina. O tubo foi agitado em vórtex e foi feita a leitura em um espectrofotômetro a 660 nm de comprimento de onda. O inóculo foi ajustado a um valor de absorbância de 0,1 (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL).

4.2.8 Preparo das placas de 24 poços

Distribuímos 2,7 mL de meio BHI modificado com mucina em uma placa de 24 poços. Acrescentamos em cada poço 300 µL do inóculo. Transferimos os discos com película adquirida de forma suave para não danificar a película. Incubamos a placa em estufa de CO₂ por 24 h a fim de obter a camada de biofilme sobre os discos.

4.2.9 Remoções do biofilme do corpo de prova

Após 24 h de crescimento do biofilme, retiramos a placa da estufa. Com uma pinça estéril, cada corpo de prova foi imerso uma vez em solução de soro estéril para remoção de bactérias fracamente aderidas. Fizemos o procedimento de lavagem gentilmente para não romper o biofilme. Utilizamos placas de 24 poços contendo 3 mL de NaCl 0,9% para fazer esse procedimento. Transferimos esse corpo de prova para um tubo tipo Falcon contendo 5 mL de uma solução de soro estéril. Cada tubo de falcon foi agitado por 1 minuto e em seguida sonicado por mais 1 minuto (sonicador Vibra Cell 4- 4 °C, com 5% de amplitude e 6 pulsos (9.9 s cada pulso e 5 s de intervalo);

4.2.10 Diluições

Da suspensão contendo o biofilme, retiramos 10 µL e transferimos para um eppendorf contendo 990 µL de soro estéril (diluição 1:100). Dessa diluição, toma-se uma alíquota de 100 µL transferindo-a para outro eppendorf contendo 900 µL de soro estéril (diluição 1:1000). A cada repetição deste último processo, consegue-se uma diluição 10x maior. Fizemos três diluições: $1:100 = 10^2$, $1:1000 = 10^3$ e $1:10000 = 10^4$

4.2.11 Plaqueamento

Coletamos 10 µL de cada diluição e levamos à placa de Petri com BHI Ágar. Com uma alça de vidro previamente flambada e resfriada, espalhamos a solução coletada 8 sobre toda a superfície do Ágar. Este procedimento foi realizado para todas as diluições, flambando a alça de vidro entre cada amostra. Incubamos as placas de Petri nomeadas com a respectiva diluição contida em estufa de CO² por 48 h, com o ágar voltado para cima.

4.2.12 Contagem de colônias

Após completas as 48 h de incubação em estufa de CO², retiramos as placas de Petri da estufa e escolhemos as placas que continham as melhores diluições para contagem, com pelo menos 20 colônias e até no máximo 300.

4.2.13 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a visualização no MEV, os biofilmes dos discos foram metalizados. Para isso, as amostras foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2) e fixadas solução de glutaraldeído 2,5% PBS pH 7,2) por uma hora em temperatura ambiente. Após esse período, o fixador foi removido, os discos desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95%) e transferidos para álcool absoluto. Após a desidratação, os discos foram secos em temperatura ambiente overnight e receberam três ciclos de cobertura de ouro-paládio no metalizador com ouro a 50 mA por três minutos. Após a metalização os discos foram analisados no MEV (MEV - modelo JSM 5600LV, Jeol, Tóquio, Japão) em aumentos de 1.200, 2.500 e 4.000 vezes.

4.2.14 Extração de matriz extracelular de biofilme

Após a formação do biofilme em discos de Ti por 24 h, a matriz extracelular do biofilme foi extraída conforme descrito anteriormente Aires et al. 2008. Depois de 24 h de crescimento do biofilme bacteriano, os discos foram removidos das placas e lavados 2 vezes com solução de NaCl 0,9%. Cada disco foi transferido para um tubo Falcon contendo 2 ml de solução salina e de biofilme formado, foi vortexado e sonicado. E dos tubos Falcon transferiu 800µL para outros tubos para a extração dos polissacarídeos. Com esse tubo foi centrifugado a 10000g por 5 minutos a 4° C e o sobrenadante contendo polissacarídeos extracelulares solúveis foi transferido 500µL para outro tubo nomeado de PECS e também adicionou 1,5mL de etanol 100%. Foi lavado o precipitado com 100µL de solução salina, centrifugado e descartado o sobrenadante. Para o precipitado, foi adicionado 400µL de 1M NaOH para extração de polissacarídeos insolúveis. O tubo foi vortexado, agitado por 15 minutos, centrifugado e o sobrenadante foi transferido para 9 outro tubo nomeado de PECl. O precipitado foi lavado com 100 µL 1M NaOH, centrifugado e adicionado ao tubo PECl, e o sobrenadante foi adicionado 1,5 mL de etanol 100% gelado. O tubo contendo o precipitado residual, 400 µL 1M NaOH foi adicionado para a extração de polissacarídeos intracelulares. Esse tubo foi vortexado, aquecido a 100 °C por 15 minutos, centrifugado e transferido o sobrenadante para outro tubo nomeado de PIC. O precipitado foi lavado e o PIC foi recuperado como descrito na extração do PECl. Os tubos contendo etanol 100% gelado mais PECS, PECl ou PIC foram mantidos no freezer por no mínimo 30 minutos antes da quantificação de polissacarídeos.

4.2.15 Quantificação de Polissacarídeos na matriz extracelular do biofilme

Tubos com 100% de etanol e PECS, PECl ou PIC, foram centrifugados e lavados com etanol 75% duas vezes. A quantificação de polissacarídeos totais foi utilizada a técnica do fenol-sulfúrico utilizando a glicose como padrão (DuBois M 1956). Foram preparados 2 tubos para cada ponto da curva e realizado uma leitura à 490nm.

5 RESULTADOS

A avaliação da adesão bacteriana foi realizada por contagem das células, por quantificação de polissacarídeos de matriz extracelular e por MEV. Na figura 1, estão expostas a média e desvio padrão de UFC/mL das células bacterianas aderidas aos discos. Não houve diferença entre os grupos A (usinado), B (microtopografia) e C (com nanotopografia) ($p>0,05$; ANOVA). Os dados foram comparados utilizando ANOVA e Tukey. Os valores de média e desvio padrão para a contagem de colônias foram (em unidades formadoras de colônia por mL - UFC/mL, figura 1): Grupo A- $1,64 \times 10^6$ ($4,10 \times 10^5$), Grupo B- $1,96 \times 10^6$ ($4,61 \times 10^5$) e Grupo C $1,56 \times 10^6$ ($6,23 \times 10^5$).

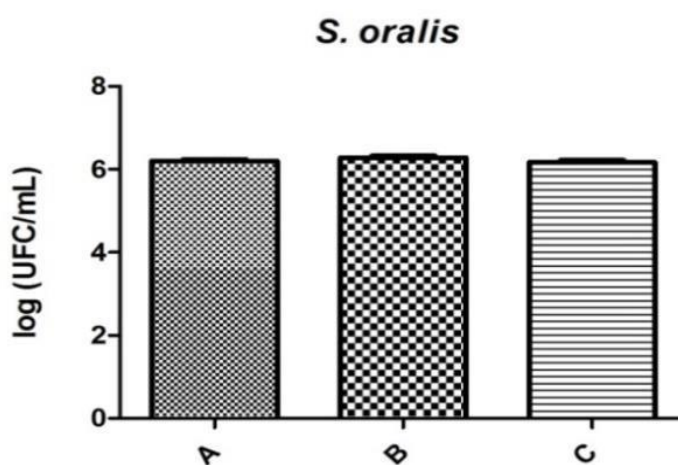


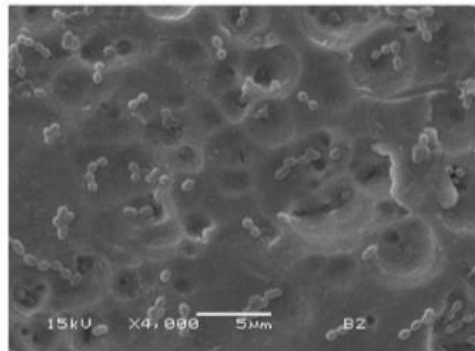
Figura 1 - Média e desvio padrão do logaritmo de UFC/mL para os grupos A (usinado), B (microtopografia) e C (nanotopografia). Não foi encontrada diferença entre os grupos ($p>0,05$, ANOVA)

Em relação à produção de polissacarídeos, não foi possível quantificar os polissacarídeos totais pela metodologia do fenol sulfúrico. Como houve baixa produção de biofilme, provavelmente houve baixa produção desses polissacarídeos, principalmente os da matriz extracelular. Portanto, a produção foi abaixo do limite de detecção do método empregado para a quantificação.

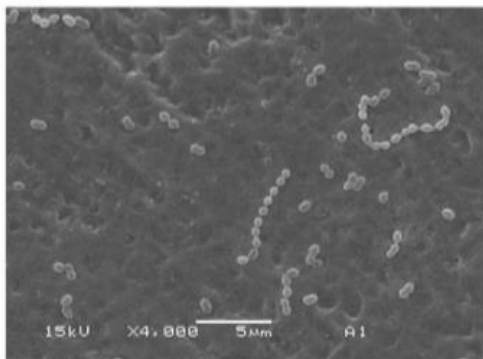
As imagens de microscopia de varredura (MEV) mostraram uma adesão inicial de *S. oralis*, com a presença única dos estreptococos distribuída por toda a superfície do titânio. Foi possível observar também pouca presença de matriz extracelular, o que demonstra uma formação de biofilme em estágio inicial. A Figura 2 representa a adesão de *S. oralis* nas superfícies de titânio.

Streptococcus oralis

B



A



C

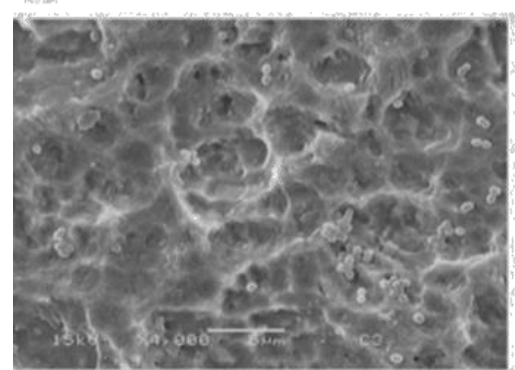


Figura 2. Imagens da adesão de *S.oralis* sobre as superfícies de titânio para os grupos A (usinado), B (microtopografia) e C (nanotopografia). Aumento de 4000 vezes.

6 DISCUSSÃO

Diferentes superfícies de implante têm sido testadas para aumentar a taxa e o grau de osseointegração; a modificação das micro e nano-topografias parecem estimular a atividade osteoblástica, formação de matriz extracelular e mineralização óssea (Gutwein e Webster, 2004; Thakral et al., 2014). As superfícies de titânio com nanotopografia utilizada no estudo foram estudadas previamente a fim de avaliar sua capacidade de osteogênese e de osseointegração, apresentando bons resultados (Schwartz-Filho, et al. 2012). No entanto, ainda é desconhecido se a topografia da superfície pode interferir também na adesão microbiana. No presente estudo, pode-se observar que a nanotopografia não influenciou na adesão inicial de *S. oralis*.

O estudo pretendia avaliar a formação de biofilme em um período de 24 horas. De acordo com os resultados encontrados na quantificação de biofilme por contagem de colônias, quantificação de polissacarídeos e por microscopia eletrônica de varredura, o perfil de colonização bacteriana não foi diferente entre as superfícies. Esses resultados demonstram que nem topografia das superfícies e nem a diferença de rugosidade entre eles influenciou de forma relevante a colonização bacteriana. Outros estudos também tiveram como objetivo examinar a formação de biofilme e os resultados foram semelhantes nas diferentes superfícies (Schmidlin et al., 2013).

A produção de polissacarídeos não foi possível ser quantificada pela metodologia do fenol sulfúrico. Houve baixa produção de biofilme, caracterizando uma adesão inicial da bactéria às superfícies. Dessa forma, houve baixa produção de polissacarídeos, principalmente os da matriz extracelular do biofilme. Portanto, a produção deve ter sido abaixo do limite de detecção do método empregado para a quantificação. Isso pode ser comprovado pelas imagens de microscopia de varredura (MEV) que mostraram a adesão inicial de *S. oralis*, com a presença de estreptococos distribuídos pelas diferentes superfícies do titânio. Foi observada também pouca presença de matriz extracelular, característico da formação de um biofilme em estágio inicial (estágio inicial de adesão bacteriana). As superfícies aqui estudadas já foram caracterizadas quanto à rugosidade e quanto a sua topografia.

A superfície com microtopografia apresentou maior rugosidade (média e desvio padrão de $S_a = 0,57 \pm 0,05 \mu\text{m}$) do que os grupos nano ($0,27 \pm 0,07$) e usinado ($0,28 \pm 0,02$) (Schwartz et al., 2012). No entanto, apesar da diferença de rugosidade ser significativa, a colonização bacteriana apresentou-se muito semelhante. Ainda não está bem estabelecida na literatura científica em qual proporção a rugosidade pode interferir na adesão bacteriana.

Na literatura científica ainda não há uma confirmação da proporção que a rugosidade pode interferir na adesão bacteriana. Há estudos que apresentaram direta relação entre o aumento da rugosidade-topografia e a adesão microbiana (Al-Ahmad et al., 2013; Dorkhan et al., 2011; Frojd et al., 2011; Burguers et al., 2009; Subramani et al., 2009; Telgheus et al., 2006; Nakazato et al., 1997; Rimondini et al., 1997; Quyrinen e Bollen, 1995). Porém, outros estudos apresentaram resultados semelhantes aos do presente estudo, onde foram encontrados que em superfícies com rugosidade inferior a 1,0 micrometro (Grobner-Schreiber et al., 2001; Frojd et al., 2011b; Al-Ahmad et al., 2010) não interferiram na adesão bacteriana, contrapondo a relação direta entre rugosidade e adesão microbiana. Assim como os estudos de Lin et al., em 2011, que trabalharam com superfície superior a 1 micrometro.

Outro estudo também que apresentou resultados semelhantes ao do presente estudo, onde a adesão bacteriana inicial em diferentes superfícies ao titânio não obteve resultados com diferenças significantes (Ribeiro et al., 2016).

Estudos compararam a formação de biofilme em implantes dentários inteiros de titânio com diferentes microtopografias de superfície. Um modelo de biofilme multiespécie *in vitro* consistindo de colonizadores inicial (*Streptococcus oralis* e *Actinomyces naeslundii*), precoce (*Veillonella parvula*), secundário (*Fusobacterium nucleatum*) e tardio (*Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Os biofilmes resultantes foram estudados com Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM) e Microscópio Eletrônico de Varredura. Diferente do presente estudo, os implantes com superfícies de rugosidade moderada acumularam mais biomassa bacteriana e número significativamente maior de bactérias patogênicas (*F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*), quando comparados a implantes com superfícies de rugosidade mínima, dentro de uma estrutura de biofilme semelhante (Bermejo et al., 2019).

Outro trabalho que utilizou a bactéria *S.oralis* foi o de Sánchez em 2015, avaliou *in vitro* o desenvolvimento de um modelo complexo de biofilme em superfícies de implantes de titânio e zircônio e compará-lo com o mesmo biofilme formado na superfície de hidroxiapatita. Diferentes superfícies, no entanto, demonstraram diferenças tanto na espessura, na deposição da matriz polissacarídica extracelular quanto na organização das células bacterianas. Enquanto a formação e dinâmica de um modelo de biofilme *in vitro* foi semelhante, independentemente da superfície de inoculação (hidroxiapatita, titânio ou zircônio), Diferente do trabalho realizado no presente estudo, houve diferenças significativas em relação à espessura do biofilme e à estrutura tridimensional (Sánchez et al, 2015)

3 CONCLUSÃO

Em resumo concluímos que apesar de a hipótese do estudo ser a de que as superfícies com superfície lisa (usinado) e com nanotopografia apresentariam uma menor adesão microbiana do que os discos com microtopografia, a mesma não foi confirmada. Todos os discos apresentaram resultados semelhantes em relação à adesão de *S. oralis*, independentemente do tipo de superfície e da diferença de rugosidade dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, Richards VP, Brady LJ, Lemos JA. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr*. 2018 Oct;6(5). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.
- Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Fackler A, Follo M, Hellwig E, Bächle M., et al. In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Arch Oral Biol*. 2013 Sep;58(9):1139-47. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.04.011.
- Annunziata M, Guida L. The Effect of Titanium Surface Modifications on Dental Implant Osseointegration. *Front Oral Biol*. 2015;17:62-77. doi: 10.1159/000381694.
- Astrand P, Ahlqvist J, Gunne J, Nilson H. Implant treatment of patients with edentulous jaws: a 20-year follow-up. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008 Dec;10(4):207-17. doi: 10.1111/j.1708-8208.2007.00081.x.
- Attia S, Schaper E, Schaaf H, Pons-Kühnemann J, Schlenz MA, Streckbein P, Böttger S, Howaldt HP, Wilbrand JF. Evaluation of Implant Success in Patients with Dental Aplasia. *Biomed Res Int*. 2019 Jun 19;2019:1680158. doi: 10.1155/2019/1680158.
- Atieh MA, Alsabeeha NH, Faggion CM Jr, Duncan WJ. The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2013 Nov;84(11):1586-98. doi: 10.1902/jop.2012.120592.
- Bermejo P, Sánchez MC, Llama-Palacios A, Figuero E, Herrera D, Sanz Alonso M. Biofilm formation on dental implants with different surface micro-topography: An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2019 Aug;30(8):725-734. doi: 10.1111/clr.13455.
- Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J., et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977;16:1-132.
- Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Feb;21(2):156-64. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01815.x.
- Cavalli N, Austoni C, Corbella S, Taschieri S, Barbaro B, Azzola F., et al. Retrospective analysis of the prevalence of peri-implant diseases in non-smoking patients rehabilitated with a fixed full-arch restoration, supported by two mesial axial and two distal tilted implants. *Minerva Stomatol*. 2016 Jun;65(3):164-75.

Doll K, Yang I, Fadeeva E, Kommerein N, Szafranski SP, Bei der Wieden G, Greuling A, Winkel A, Chichkov BN, Stumpp NS, Stiesch M. Liquid-Infused Structured Titanium Surfaces: Antiadhesive Mechanism to Repel *Streptococcus oralis* Biofilms. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 Jul 3;11(26):23026-23038. doi:10.1021/acsami.9b06817.

Do T, Jolley KA, Maiden MC, Gilbert SC, Clark D, Wade WG, Beighton D. Population structure of *Streptococcus oralis*. *Microbiology*. 2009 Aug;155(Pt 8):2593-602. doi: 10.1099/mic.0.027284-0.

Dorkhan M, Hall J, Uvdal P, Sandell A, Svensäter G, Davies JR. Crystalline anatase-rich titanium can reduce adherence of oral streptococci. *Biofouling*. 2014;30(6):751-9. doi: 10.1080/08927014.2014.922962.

DuBois M, G. K., Hamilton JK, Rebers PA, Smith F Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356, 1956. Doi 10.1021/ac60111a017

Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Santos; 2005

Ferreira Ribeiro C, Cogo-Müller K, Franco GC, Silva-Concílio LR, Sampaio Campos M, de Mello Rode S., et al. Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. 2016 Sep;69:33-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.05.00

Fransson C, Lekholm U, Jemt T, Berglundh T. Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Aug;16(4):440-6.

Fröjd V, Chávez de Paz L, Andersson M, Wennerberg A, Davies JR, Svensäter G. In situ analysis of multispecies biofilm formation on customized titanium surfaces. *Mol Oral Microbiol*. 2011 Aug;26(4):241-52. doi: 10.1111/j.2041-1014.2011.00610.x.

Graner ROM, Gonçalves RG, Höfling JF, Furlan LM, Apostila 2 Disciplina: Pré-Clínica II (DP-201) Aspectos microbiológicos da placa dental 2005. Disponível em: file:///C:/Users/Marcela/Downloads/Microbiologia_Apostila2-2005b.pdf

Gomes F, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on structure and composition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm matrix. *Curr Microbiol*. 2011 Oct;63(4):354-9. doi: 10.1007/s00284-011-9984-3.

Gutwein LG, Webster TJ. Increased viable osteoblast density in the presence of nanophase compared to conventional alumina and titania particles. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(18):4175-83.

Jäger M, Jennissen HP, Dittrich F, Fischer A, Köhling HL. Antimicrobial and Osseointegration Properties of Nanostructured Titanium Orthopaedic Implants. *Materials (Basel)*. 2017 Nov 13;10(11). pii: E1302. doi: 10.3390/ma10111302.

Kang DW, Kim SH, Choi YH, Kim YK. Repeated failure of implants at the same site: a retrospective clinical study. 2019 Jul 10;41(1):27. doi: 10.1186/s40902-019-0209-1

Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK., et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Nov;52(5):782-9.

Lang NP, Jepsen S; Working Group 4. Implant surfaces and design (Working Group 4). *Clin Oral Implants Res*. 2009 Sep;20 Suppl 4:228-31. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01771.x.

Lasserre JF, Brex MC, Toma S. Oral Microbes, Biofilms and Their Role in Periodontal and Peri-Implant Diseases. 2018 Sep 22;11(10). pii: E1802. doi: 10.3390/ma11101802.

Lekholm U, Gröndahl K, Jemt T. Outcome of oral implant treatment in partially edentulous jaws followed 20 years in clinical function. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2006;8(4):178-86.

Lin HY, Liu Y, Wismeijer D, Crielaard W, Deng DM. Effects of oral implant surface roughness on bacterial biofilm formation and treatment efficacy. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013 Sep-Oct;28(5):1226-31. doi: 10.11607/jomi.3099.

Mekayarajjananonth T, Winkler S. Contact angle measurement on dental implant biomaterials. *J Oral Implantol*. 1999;25(4):230-6.

Mombelli A, Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:203-13. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01666.x.

Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdanian A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdanian M., et al. Oral microbial biofilms: an update. 2019 Aug 1. doi: 10.1007/s10096-019-03641-9

Muñoz V, Duque A, Giraldo A, Manrique R. Prevalence of Peri-implant Disease According to Periodontal Probing Depth and Bleeding on Probing: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018 Jul/Aug;33(4):e89-e105. doi: 10.11607/jomi.5940.

Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S., et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res*. 1998 May;40(2):324-35.

Nyvad, B. & Kilian, M. (1990;). Microflora associated with experimental root surface caries in humans. *Infect Immun* 58, 1628–1633.

Ogle OE. Implant surface material, design, and osseointegration. *Dent Clin North Am*. 2015 Apr;59(2):505-20. doi: 10.1016/j.cden.2014.12.003.

Pachauri P, Bathala LR, Sangur R. Techniques for dental implant nanosurface modifications. *J Adv Prosthodont*. 2014 Dec;6(6):498-504. doi: 10.4047/jap.2014.6.6.498.

Pongnarisorn NJ, Gemmell E, Tan AE, Henry PJ, Marshall RI, Seymour GJ. Inflammation associated with implants with different surface types. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Feb;18(1):114-25.

Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 1995 Jan;22(1):1-14.

Renvert S, Polyzois I, Claffey N. How do implant surface characteristics influence peri-implant disease? *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:214-22. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01661.x.

Renvert S, Polyzois I. Treatment of pathologic peri-implant pockets. *Periodontol 2000*. 2018 Feb;76(1):180-190. doi: 10.1111/prd.12149.

Rimondini L, Farè S, Brambilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F., et al. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *J Periodontol*. 1997 Jun;68(6):556-62.

Sánchez MC, Llama-Palacios A, Fernández E, Figuero E, Marín MJ, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. An in vitro biofilm model associated to dental implants: structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. *Dent Mater*. 2014 Oct;30(10):1161-71. doi: 10.1016/j.dental.2014.07.008.

Schmidlin PR, Müller P, Attin T, Wieland M, Hofer D, Guggenheim B. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. *J Appl Oral Sci*. 2013 Jan-Feb;21(1):48-55.

Schwartz Filho, HO. Osteogênese sobre titânio com nanotopografia. Araraquara: [s.n.], 2011. 148 f.

Schwartz-Filho HO, S.-N. R., Conte-Neto N, Del Barrio RA, Marcantonio E Jr. Evolução dos implantes dentários. *Avanços em Periodontia e Implantodontia - paradigmas e desafios*. Nova Odessa, Editora Napoleão, 2011

Schwartz-Filho HO, Bougas K, Coelho PG, Xue Y, Hayashi M, Faeda RS., et al. The effect of laminin-1-doped nanoroughened implant surfaces: gene expression and morphological evaluation. *Int J Biomater*. 2012;2012:305638. doi: 10.1155/2012/305638.

Schwartz-Filho HO, Morandini AC, Ramos-Junior ES, Jimbo R, Santos CF, Marcantonio E Jr., et al. Titanium surfaces with nanotopography modulate cytokine production in cultured human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Oct;100(10):2629-36. doi: 10.1002/jbm.a.34200.

Silva TSO, Freitas AR, Pinheiro MLL, do Nascimento C, Watanabe E, Albuquerque RF. Oral Biofilm Formation on Different Materials for Dental Implants. *J Vis Exp*. 2018 Jun 24;(136). doi: 10.3791/57756.

Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, Beck-Broichsitter B, Jung O, Precht C., et al. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6285620. doi: 10.1155/2016/6285620.

Stokman MA, van Winkelhoff AJ, Vissink A, Spijkervet FK, Raghoobar GM. Bacterial colonization of the peri-implant sulcus in dentate patients: a prospective observational study. *Clin Oral Investig*. 2017 Mar;21(2):717-724. doi: 10.1007/s00784-016-1941-x.

Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Jul-Aug;24(4):616-26.

Sztukowska MN, Roky M, Demuth DR. Peptide and non-peptide mimetics as potential therapeutics targeting oral bacteria and oral biofilms. 2019 Aug 7. doi: 10.1111/omi.12267
Thylstrup, A. e Fejerskov, O. *Cariologia Clínica*. 2. ed. São Paulo: Santos, 2001.

W. G. Characklis, P. A. Wilderer. John Wiley and Sons, Chichester, *Structure and Function of Biofilms* Edited 1989 doi.org/10.1002/jctb.280500315

Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials*. 1996 Jan;17(1):15-22.

Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010 Jan-Feb;25(1):63-74.

Wróblewska M, Strużycka I, Mierzwińska-Nastalska E. Significance of biofilms in dentistry. *Przegl Epidemiol*. 2015;69(4):739-44, 879-83.

ANEXOS

Anexo 1 –Verificação de originalidade e prevenção de plágio

TCC

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

13%

ÍNDICE DE SEMELHANÇA

12%

FONTES DA INTERNET

3%

PUBLICAÇÕES

%

DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1

repositorio.unesp.br

Fonte da Internet

6%

2

www.sbpqo.org.br

Fonte da Internet

3%

3

repositorio.ufu.br

Fonte da Internet

1%

4

hdl.handle.net

Fonte da Internet

<1%

5

repositorio.unicamp.br

Fonte da Internet

<1%

6

arca.icict.fiocruz.br

Fonte da Internet

<1%

7

Rehmer, Oliver. "Detektion und Visualisierung von Mikroorganismen in der In-situ-Pellikel mit verschiedenen Verfahren", Universität Freiburg, 2008.

Publicação

<1%

8

Patricia Bermejo, María Carmen Sánchez,

Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação da formação de biofilme de *Streptococcus oralis* em discos de titânio com micro e nanotopografia: estudo *in vitro*", CAAE 56790616.4.0000.5418, dos pesquisadores Marcela Kim Takemoto de Araújo e Karina Cogo Müller, satisfaz as exigências das resoluções específicas sobre ética em pesquisa com seres humanos do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde e foi aprovado por este comitê em 29/06/2016.

The Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School of the University of Campinas (FOP-UNICAMP) certifies that research project "Evaluation of *Streptococcus oralis* of biofilm formation on titanium disks with micro and nanotopography : *in vitro study*", CAAE 56790616.4.0000.5418 , of the researcher's Marcela Kim Takemoto de Araújo and Karina Cogo Müller, meets the requirements of the specific resolutions on ethics in research with human beings of the National Health Council - Ministry of Health, and was approved by this committee on June, 29 2016.

Profa. Fernanda Miori Pascon

Vice Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Junior

Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparecem como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.

Anexo 3 –Iniciação Científica

Seja bem-vindo(a) MARCELA KIM TAKEMOTO DE ARAUJO

— Inscrição realizada em 22/04/2016
17:16:29

**Seu projeto foi aprovado em
1ª chamada.**

— Aceite foi emitido em 06/07/2016
13:15:24
— Aceite do orientador emitido em
07/07/2016 16:39:38

Calendário da Quota

— Inscrição de Projetos: 01/04/2016 -
26/04/2016
— Avaliação das inscrições: 02/05/2016 -
01/07/2016
— Relatório Parcial: 01/02/2017 -
13/02/2017
— Relatório Final: 01/08/2017 - 14/08/2017

Relatório Final

Período de envio do Relatório Final: 01/08/2017 - 14/08/2017

Versão enviada em 14/08/2017 12:53:14 [ver relatório](#)

— Parecer do orientador emitido em 14/08/2017 20:18:44

— Parecer do Assessor dado em 18/01/2018 13:26:30
(O parecer a respeito de seu relatório está disponível ao orientador responsável)

● **Aprovado**