



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**EDUARDO PEDRO DE CARVALHO FILHO**

**AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO NA  
ADESÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEOS E OSTEÓBLASTOS**

RIBEIRÃO PRETO

2024

**EDUARDO PEDRO DE CARVALHO FILHO**

**AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO NA  
ADESÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEOS E OSTEÓBLASTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

Ribeirão Preto

2024

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento  
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

CARVALHO FILHO, Eduardo Pedro de, 1984-

C331a Avaliação da modificação da superfície de titânio na  
adesão de lipopolissacarídeos e osteoblastos / Eduardo Pedro  
de Carvalho Filho. – Ribeirão Preto, 2024.

46 f. : il. color.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Gonçalves Basso.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Doutorado em Odontologia, 2024.

1. Titânio. 2. Hidróxido de sódio. 3. Ácido fluorídrico. 4.  
Lipopolissacarídeos. 5. Osteoblastos. II. Título.

CDD 617.6

**EDUARDO PEDRO DE CARVALHO FILHO**

**AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO NA ADESÃO  
DE LIPOPOLISSACARÍDEOS E OSTEÓBLASTOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção de título de Doutor em Odontologia.

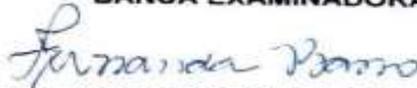
Orientador(a): Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso Lombardi

Área de concentração: Implantodontia

Data de defesa: 01 de fevereiro de 2024

Resultado: Aprovado

**BANCA EXAMINADORA**



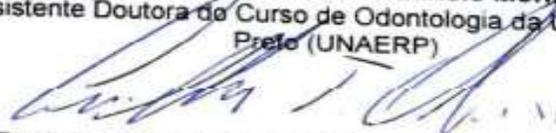
**Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso Lombardi (Presidente)**  
Professora Doutora do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto  
(UNAERP)



**Profa. Dra. Larissa Morfêira Spinola de Castro-Raucci**  
Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão  
Preto (UNAERP)



**Profa. Dra. Izabela Cristina Maurício Moris Rivera**  
Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão  
Preto (UNAERP)



**Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira**  
Professor Adjunto da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de  
Uberlândia (UFU)



**Profa. Dra. Taisa Nogueira Pansani**  
Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Faculdade de  
Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e aos meus familiares que sempre me apoiaram e acreditaram no meu sonho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** que me sustentou em todos os momentos para continuar forte e acreditando em meus sonhos. Me ajudou a conseguir suportar todas as dificuldades encontradas ao longo do caminho. Sei que tudo que sou e tenho devo à Ele e agradeço por me permitir mais esta conquista.

Aos meus pais, **Eduardo Pedro de Carvalho e Telma Eduardo da Silva Carvalho**, que sempre me motivaram e fizeram sacrifícios para que eu pudesse estudar e estar aqui hoje, honrando tudo o que fizeram por mim. Esta conquista também é de vocês, e minha gratidão é eterna. Vocês são meus maiores exemplos.

À minha irmã **Emily Eduardo Carvalho Silva** por sempre estar ao meu lado e por me apoiar a cada escolha.

À minha amada esposa, **Isabella Duarte de Oliveira Carvalho**, que nunca deixou que eu desistisse, permanecendo ao meu lado ao longo de toda essa jornada, acreditando em mim, oferecendo apoio incondicional e incentivando-me a perseguir todos os meus sonhos. Obrigado por ser a pessoa incrível que você é em todos os momentos.

À minha sogra, **Simone Rita Ferreira Duarte** que sempre orou por mim e sempre me tratou como um filho.

À minha professora e orientadora **Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso**, por ter acreditado em mim, pela paciência e pelas inúmeras oportunidades que me deu. Você foi essencial nesse processo.

À minha colega de pesquisa e colaboradora do meu trabalho, **Doutoranda Isabela Massaro Ribeiro**, que tanto me ajudou. Sem você também não teria sido possível. Obrigado.

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da sua Reitora **Profa. Dra. Suzulei de Castro França**, personalidade constante e pioneira na educação nacional. Obrigada pela oportunidade de poder concretizar mais esse sonho.

À Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Odontologia **Profa. Dra. Yara Teresinha Correa Silva Sousa**, pelo incentivo, paciência e ajuda em todo o curso.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, que não apenas transmitiram conhecimento nas disciplinas, mas também enriqueceram minha formação profissional e pessoal, expresse minha sincera gratidão pelas oportunidades e pelo impacto significativo que tiveram em meu crescimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa e ao CNPQ.

Aos Laboratórios de Patologia Experimental e Biomateriais e de Biologia Óssea, da do Departamento de Fisiologia e Patologia da **Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP**, pela oportunidade de realizar a pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

Modificações na superfície do titânio (Ti) aumentam a rugosidade superficial e a área de contato do material com o tecido ósseo receptor. Apesar dos resultados promissores destas modificações sobre os tecidos peri-implantares, sua influência na adesão de produtos bacterianos ainda não foi completamente elucidada, sendo necessário a análise não só da rugosidade e topografia, mas também da adesão de lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* (*E.coli*) e na adesão e metabolismo de osteoblastos humanos.. Este estudo avaliou os efeitos da adesão de lipopolissacarídeos (LPS) sobre a superfície de discos de Ti puro tipo IV, sendo eles polidos e modificados por alcalinização (NaOH 5M) e ácido fluorídrico (HF 10%), sendo avaliado também a adesão de osteoblastos e a viabilidade destes. Os discos foram submetidos à análise de topografia e rugosidade superficiais através de MEV (microscopia eletrônica de varredura). Então, uma solução com LPS de *Escherichia coli* (1 µg/mL) foi aplicada por 24 horas sobre a superfície de cada disco, seguido de análise da adesão do LPS por meio de microscopia de fluorescência (qualitativa) e intensidade de fluorescência em fluorímetro (quantitativa). A seguir, osteoblastos humanos (SaOs-2 –  $2 \times 10^4$  células) foram cultivados sobre cada superfície. Após este período, foram determinadas a adesão celular, viabilidade e síntese de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Os dados de rugosidade, adesão quantitativa, viabilidade celular e síntese de TNF- $\alpha$  foram submetidos aos testes de ANOVA a dois critérios e Tukey ( $\alpha=0,05$ ), enquanto os dados de topografia, adesão qualitativa do LPS e adesão celular foram analisados descritivamente. Os tratamentos alcalino e ácido resultaram em alteração da topografia e aumento significativo da rugosidade superficial média dos discos de titânio ( $p<0,05$ ). Maior adesão de LPS ocorreu nos discos submetidos aos tratamentos ácido e alcalino, sendo que a superfície alcalinizada apresentou maior adesão qualitativa de LPS. Maior intensidade de fluorescência ocorreu nos discos tratados em comparação com os polidos. A adesão dos osteoblastos foi notadamente superior nas superfícies tratadas, porém, essa adesão foi prejudicada na presença de LPS. No que diz respeito à viabilidade celular, constatou-se um impacto negativo apenas nas células cultivadas sobre os discos tratados com NaOH na presença de LPS. Entretanto, a síntese de TNF- $\alpha$  foi mais elevada nas células expostas ao LPS em todas as superfícies testadas; contudo, as células cultivadas sobre a superfície polida foram as que apresentaram uma síntese mais acentuada desta citocina. Concluiu-se que os tratamentos ácidos e alcalinos da superfície de Ti favorecem a adesão do LPS além de modular a resposta de osteoblastos.

Palavras-chave: Titânio; Hidróxido de sódio; Ácido fluorídrico; Lipopolissacarídeos; Osteoblastos.

## ABSTRACT

Modifications to the surface of titanium (Ti) increase the surface roughness and the contact area of the material with the receiving bone tissue. Despite the promising results of these modifications on peri-implant tissues, their influence on the adhesion of bacterial products has not yet been completely elucidated, making it necessary to analyze not only the roughness and topography, but also the adhesion of lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli* (*E.coli*) and on the adhesion and metabolism of human osteoblasts. This study evaluated the effects of the adhesion of lipopolysaccharides (LPS) on the surface of type IV pure Ti discs, which were polished and modified by alkalization (5M NaOH) and acid fluoride (HF 10%), and the adhesion of osteoblasts and their viability were also evaluated. The discs were subjected to topography and surface roughness analysis using SEM (scanning electron microscopy). Then, a solution with LPS from *Escherichia coli* (1µg/mL) was applied for 24 hours on the surface of each disc, followed by analysis of LPS adhesion through fluorescence microscopy (qualitative) and fluorescence intensity in a fluorimeter (quantitative). Next, human osteoblasts (SaOs-2 – 2 x 10<sup>4</sup> cells) were cultured on each surface. After this period, cell adhesion, viability and synthesis of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) were determined. Roughness, quantitative adhesion, cell viability and TNF-α synthesis data were subjected to two-way ANOVA and Tukey tests ( $\alpha=0.05$ ), while topography data, LPS qualitative adhesion and cell adhesion were analyzed descriptively. The alkaline and acid treatments resulted in changes in the topography and a significant increase in the average surface roughness of the titanium discs ( $p<0.05$ ). Greater adhesion of LPS occurred on discs subjected to acid and alkaline treatments, with the alkalized surface showing greater qualitative adhesion of LPS. Greater fluorescence intensity occurred in treated discs compared to polished ones. Osteoblast adhesion was notably higher on treated surfaces, however, this adhesion was impaired in the presence of LPS. With regard to cell viability, a negative impact was found only in cells cultured on discs treated with NaOH in the presence of LPS. However, TNF-α synthesis was higher in cells exposed to LPS on all surfaces tested; however, the cells grown on the polished surface were those that showed a greater synthesis of this cytokine. It was concluded that acid and alkaline treatments of the Ti surface favor the adhesion of LPS in addition to modulating the osteoblast response.

Key-words: Titanium; Sodium hydroxide; Hydrofluoric acid; Lipopolysaccharides; Osteoblasts.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma do delineamento experimental utilizado para o desenvolvimento do estudo.....	10
Figura 2 - Representação da sequência de padronização dos discos de titânio .....	10
Figura 3 - Representação esquemática do tratamento da superfície dos discos de titânio com NaOH e HF.....	10
Figura 4 - Representação esquemática da análise de topografia e rugosidade superficiais por meio de MEV.....	10
Figura 5 - Representação esquemática do delineamento experimental através da esterilização dos discos de titânio alocados, após a esterilização, em placas de 24 compartimentos.....	10
Figura 6 - Representação esquemática da aplicação do LPS sobre os discos de titânio e análise qualitativa por meio de microscopia de fluorescência.....	10
Figura 7 - Representação esquemática da análise quantitativa da adesão do LPS sobre as superfícies dos discos de titânio.....	10
Figura 8 - Representação esquemática da análise de topografia e rugosidade superficiais.....	10
Figura 9 - Representação esquemática da análise da adesão dos osteoblastos aos diferentes substratos na presença do LPS.....	10
Figura 10 - Representação da análise da adesão dos osteoblastos aos diferentes substratos.....	10
Figura 11 - Representação do ensaio de PrestoBlue, para avaliação da viabilidade dos osteoblastos após cultivo sobre diferentes superfícies.....	10
Figura 12 - Representação do protocolo de imunoenensaio ELISA, para determinação da concentração de TNF-alfa no meio de cultura em contato com os osteoblastos durante 24 horas de cultivo.....	10

Figura 13 - Fotomicrografias das amostras de discos de titânio polidos ou submetidos aos diferentes tratamentos de superfície NaOH e HF, por meio de microscopia eletrônica de varredura e análise qualitativa da topografia superficial de cada amostra, analisada por meio do software Image J.....10

Figura 14 – Gráfico da rugosidade superficial dos discos polidos e submetidos aos tratamentos por alcalinização por NaOH ou tratamento com ácido fluorídrico. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ),  $n=6$ .....10

Figura 15 - Fotomicrografias da análise da adesão do LPS conjugado a fluoresceína sobre as amostras de discos de titânio polidos ou submetidos aos diferentes tratamentos de superfície, por meio de microscopia de fluorescência (x100) .....10

Figura 16 – Gráfico da intensidade de fluorescência das amostras de discos de titânio polidos, tratados com hidróxido de sódio ou ácido fluorídrico na ausência e presença do LPS acoplado a uma fluoresceína. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ) .....10

Figura 17 - Fotomicrografias das amostras de osteoblastos cultivados sobre discos de titânio polidos ou submetidos aos diferentes tratamentos de superfície, por meio de microscopia de fluorescência. Nas amostras, o citoesqueleto celular pode ser identificado em vermelho (filamentos de actina), enquanto os núcleos estão identificados em azul (DNA) (x100) .....10

Figura 18 - Viabilidade dos osteoblastos cultivados sobre discos de titânio polidos, tratados com hidróxido de sódio ou ácido fluorídrico na ausência e presença do LPS acoplado a uma fluoresceína. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ) .....10

Figura 19 - Síntese de TNF- $\alpha$  por osteoblastos cultivados sobre os discos de titânio polidos, tratados com hidróxido de sódio ou ácido fluorídrico na ausência e presença do LPS acoplado a uma fluoresceína. Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ),  $n=6$ .....10

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1	OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO.....	18
3.2	MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE POR MEIO DE TRATAMENTO ÁCIDO E ALCALINIZAÇÃO.....	18
3.3	ANÁLISE DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE DA SUPERFÍCIE..	19
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
3.5	ANÁLISE QUALITATIVA DA ADESÃO DOS LPS AO SUBSTRATO.....	20
3.6	ANÁLISE QUANTITATIVA DA ADESÃO DO LPS AO SUBSTRATO.....	21
3.7	ANÁLISE DA MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE SOBRE ADESÃO E METABOLISMO DE OSTEÓBLASTOS	22
3.8	ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR.....	23
3.9	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	24
3.10	ANÁLISE DA SÍNTESE DE TNF- $\alpha$ .....	25
3.11	ANÁLISE DOS DADOS.....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
4.1	TOPOGRAFIA SUPERFICIAL.....	27
4.2	RUGOSIDADE SUPERFICIAL.....	28
4.3	ADESÃO DO LPS AO SUBSTRATO – ANÁLISE QUALITATIVA..	28
4.4	ADESÃO DO LPS AO SUBSTRATO- ANÁLISE QUANTITATIVA..	29
4.5	ADESÃO DOS OSTEÓBLASTOS AO SUBSTRATO.....	30
4.6	VIABILIDADE CELULAR.....	31
4.7	SÍNTESE DE TNF- $\alpha$ .....	32

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## INTRODUÇÃO

Os implantes dentários são utilizados para a substituição de elementos dentais, na reabilitação de áreas edêntulas, sendo elas parciais ou totais. Atualmente, este é o elemento reabilitador mais utilizado na Odontologia, sendo que aproximadamente 12 milhões de implantes são utilizados para reabilitação dentária todos os anos em todo o mundo. (Albrektsson *et al.*, 2014). De acordo com o Centro Nacional de Estatísticas de Saúde (NCHS) em 2019, mais de 36 milhões de americanos eram edêntulos e em sua maioria totais. Além disso, 120 milhões de pessoas necessitavam de reabilitação de ao menos um dente; estima-se ainda que 200 milhões de indivíduos sofrerão de perdas dentárias nos próximos 15 anos.

Após a instalação dos implantes, espera-se que ocorra a osseointegração dos mesmos aos ossos maxilares, representada por meio do contato direto estrutural da superfície do implante de titânio com o osso vivo e organizado, sem a interposição de tecido de granulação entre a superfície do implante e o osso, e que esteja recebendo a carga funcional (BRANEMARK., 1977), de forma a atingir a resistência necessária para suportar as próteses dentárias e as forças mastigatórias (JAVED *et al.*, 2010).

O Titânio (Ti) e suas ligas são amplamente utilizados na área médica e odontológica devido às suas propriedades físicas e mecânicas, como alta resistência à fadiga e desgaste, excelente resistência à corrosão, além de ter citocompatibilidade (SIVARAMAN K *et al.*, 2018). Desta forma, diversos estudos realizados a longo prazo, nos mostram que o Ti é considerado o material de implante dentário padrão ouro na implantodontia moderna, pois hoje é o material com maior volume de estudos e com maior número de casos de sucesso. (SIVARAMAN K *et al.*, 2018).

Alguns fatores locais e sistêmicos podem interferir no reparo ósseo peri-implantar (ROMANOS *et al.*, 2019). Como fatores locais inerentes ao paciente, podemos citar a quantidade de osso disponível no sítio receptor, vascularização local, a condição odontológica avaliada na oroscopia do paciente, com principal relação à saúde periodontal, devido à estreita relação entre o implante e os tecidos de sustentação orais (KULLAR & MILLER, 2019). Considerando os fatores sistêmicos, estes incluem a capacidade de resposta imune inata do indivíduo, doenças sistêmicas como diabetes, cardiopatias, as discrasias sanguíneas, hepatopatias, alterações metabólicas como a osteoporose (KULLAR & MILLER, 2019), além do uso de medicamentos, como os bisfosfonatos e outros reabsortivos (ROMANOS, 2019).

Historicamente, as modificações de superfície dos implantes de titânio começaram a ser aplicadas na década de 1980, por meio de recobrimento com partículas de hidroxiapatita e aplicação de plasma; então, nos anos 1990, outras modificações surgiram como aplicação de óxido de titânio, ataque ácido, alcalinização e anodização. A partir dos anos 2000, materiais orgânicos foram testados como recobrimento, como fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, além de medicamentos. Então, em 2010, implantes por impressão e manufatura aditiva também foram inclusos (MOHAMMAD-RAHIMI *et al.*, 2022).

Estudos anteriores demonstram que modificações na estrutura da superfície do titânio de forma a promover alterações em micro e nanoescala favorecem a osteogênese de contato e as interações de substrato – célula, acelerando o processo de osseointegração (ZHRAN *et al.*, 2016, FLAMANT *et al.*, 2016; WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2009; WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2010; WENNERBERG *et al.*; 2018). As técnicas mais utilizadas para promover aumento da rugosidade superficial do titânio são baseadas em métodos mecânicos (jateamento granulado), químicos (ataque ácido ou alcalino), eletroquímicos (anodização) e métodos físicos (spray de plasma) (DURACCIO *et al.*, 2015).

Uma destas modificações, baseada na alcalinização superficial, visa a criação de uma superfície hidrofílica e de maior rugosidade, que melhora a adesão e o metabolismo dos osteoblastos (NISHIGUCHI *et al.*, 2003; KOKUBO *et al.*, 2004; TUGULU *et al.*, 2010; KAWAI *et al.*, 2012; CARMARGO *et al.*, 2017). O tratamento alcalino também pode atuar favorecendo a adesão de moléculas orgânicas a estas superfícies, funcionalizando-as e possibilitando a modulação da resposta das células do tecido ósseo e dos tecidos circunjacentes (CAI *et al.*, 2006; ENGLE *et al.*, 2008; MIAO *et al.*, 2017; ZENG *et al.*, 2019).

As modificações por corrosão, utilizando ácidos fortes também têm sido aplicadas com o objetivo de aumentar a rugosidade superficial e a superfície de contato dos implantes com o tecido ósseo receptor (KOKUBO *et al.*, 2004). Neste contexto, o tratamento com ácido fluorídrico tem demonstrado efetividade nas alterações de superfícies de titânio, bem como na resposta de osteoblastos (TRENTO *et al.*, 2020).

No entanto, o aumento da rugosidade das superfícies dos implantes também pode resultar em maior adesão e colonização por microrganismos que estão associados ao desenvolvimento das doenças peri-implantares, como a peri-implantite (TEUGHELIS *et al.* 2006; HAN *et al.*, 2016). Apesar de haver uma relação direta entre a rugosidade e a adesão bacteriana, a formação de um

biofilme maduro também depende das interações moleculares destes microrganismos e seus produtos e as diferentes superfícies (NOUNEH *et al.*, 2001).

A peri-implantite é uma doença multifatorial, causada pela colonização dos tecidos peri-implantares por biofilmes, cuja etiopatogênese pode ser influenciada por hábitos como tabagismo, disfunções metabólicas como o diabetes, histórico de infecções associadas a bactérias como a periodontite e a má higienização. Considerado como uma infecção crônica localizada, pode atingir cerca de 5% a 10% dos implantes instalados (MOMBELLI *et al.*, 2002), ocasionando a perda irreversível da crista óssea, perda da função dos tecidos e a perda do implante (ROMANOS *et al.*, 2019). Além disso, a evolução da periimplantite também está associada a uma disbiose, isto é um desequilíbrio da microbiota local, associado à presença e patogenicidade de agentes infecciosos, como bactérias envolvidas na doença (GOMES *et al.*, 2019).

Avaliações microbiológicas de doenças peri-implantares demonstraram a presença e prevalência de patógenos como *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* e *Tannerella forsythia* (NOCITI JR. FH *et al.*, 2001).

A presença destes biofilmes nos tecidos peri-implantares resulta na liberação de lipopolissacarídeos (LPS), que atuam como potentes indutores da resposta inflamatória e podem estar direta ou indiretamente relacionados ao metabolismo e remodelação óssea.

Além das bactérias mais prevalentes, temos também bactérias comensais, cuja ativação de patogenicidade pode estar relacionada a falhas e perdas de implantes precoces, como a *E. coli*, que foi encontrada em vários casos de falhas depois de um curto período após o procedimento cirúrgico e relacionadas a peri-implantite juntamente com *Pseudomonas gingivalis* (RAMS *et al.*, 2014; ROSENBERG; TOROSIAN, 1991). Esses patógenos apresentam uma resistência importante aos antibióticos comuns encontrados e utilizados dentro da odontologia clínica; além disso, os LPS desta espécie são amplamente utilizados para a indução da resposta inflamatória e como simulação do contato celular com produtos bacterianos (MEDINA; VILLA-CORREA, 2015).

Estudos anteriores demonstraram que a ativação da resposta imunogênica celular e tecidual é dependente de espécie origem do LPS (PULENDRAN *et al.*, 2001), que pode ser derivado da diferença molecular entre esses produtos para cada microrganismo (LAU *et al.*, 2009). Além de atuar na resposta imunogênica, o LPS também pode participar da adesão da bactéria a diferentes substratos, bem como na formação do biofilme (ATABEK *et al.*, 2008).

Portanto, as propostas de modificações de superfície devem considerar não só as propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, mas também as interações com a microbiota comensal e patológica da cavidade oral (HICKOK, *et al.*, 2018). Os efeitos do controle de biofilmes por modificações de superfícies já foram relatados (KARTHIK *et al.*, 2013). No entanto, as modificações por alcalinização com hidróxido de sódio (NaOH) e com ataque ácido por ácido fluorídrico (HF) ainda são escassas.

Além da adesão, outro fator que pode ser influenciado pelas modificações de superfície é a resposta celular frente a estímulos inflamatórios e microbianos (OBANDO-PEREDA *et al.*, 2014). A doença peri-implantar se caracteriza pela presença de reações inflamatórias que afetam os tecidos peri-implantares sob função, ou seja, após receber a prótese implanto ou muco-implanto suportada (ZITZMANN *et al.*, 2001). Uma resposta inflamatória exacerbada e prolongada pode gerar uma reação não favorável aos tecidos adjacentes, acelerando a degradação da matriz extracelular óssea, enquanto uma resposta inflamatória moderada/modulada pode produzir menores efeitos colagenolíticos e de reabsorção óssea (OBANDO-PEREDA *et al.*, 2014).

Assim, o estabelecimento de superfícies que apresentem potencial de modular negativamente a adesão de biofilmes e produtos bacterianos e positivamente a resposta de células ósseas, pode acelerar o reparo peri-implantar.

## 2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo determinar o efeito das modificações da superfície de titânio, polidas e modificadas, por meio da alcalinização e acidificação, sobre a adesão de lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* (*E.coli*) e na adesão e metabolismo de osteoblastos humanos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o efeito da modificação da superfície de titânio por meio de acidificação com ácido fluorídrico e da alcalinização com hidróxido de sódio sobre:

- A topografia superficial e rugosidade de discos de titânio polidos e modificados submetidos a alcalinização com NaOH e acidificação por HF.
- A adesão de LPS de *E. coli*, por meio de microscopia de fluorescência e análise quantitativa de fluorimetria;
- A adesão de Osteoblastos humanos (SaOs-2) na presença e ausência de LPS de *E. coli*;
- A viabilidade de Osteoblastos humanos (SaOs-2) na presença e ausência de LPS de *E. coli*,
- A síntese de fator de necrose tumoral alfa por osteoblastos humanos (SaOs-2) na presença e ausência de LPS de *E. coli*



### 3.1 OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO

Para esta investigação, foram utilizados discos de titânio tipo IV, marca ASTM, com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Todos os discos foram padronizados manualmente utilizando lixas de granulação 400, 600 e 1.200, para obtenção de rugosidade superficial padronizada e depois limpos com acetona e etanol (Figura 2).

Após padronização da rugosidade superficial por meio de polimento manual, os discos foram submetidos à limpeza em cuba ultrassônica digital (Cristófoli Biosegurança, Campo Mourão, PR, BR), para eliminação de fragmentos de titânio e material orgânico nas superfícies (PARK *et al.*, 2012; CARDOSO *et al.*, 2023; PANSANI *et al.*, 2023) por meio de imersão em acetona PA por 15 minutos, etanol 70% por 15 minutos, água destilada por 15 minutos e lavagem abundante com água destilada.

Figura 2. Representação da sequência para padronização e limpeza dos discos de titânio polidos



Fonte: autor

### 3.2 MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE POR MEIO DE TRATAMENTO ÁCIDO E ALCALINIZAÇÃO

A modificação de superfície por tratamento ácido foi realizada a partir da imersão dos discos de titânio em ácido fluorídrico (Sigma-Aldrich – St Louis, MO, EUA), na concentração de

10%, por 5 minutos à temperatura ambiente (25°C) em repouso (MOURA NETO *et al.*, 2023) (Figura 3).

A modificação de superfície por alcalinização consistiu na imersão dos discos de Ti em solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 5 mol/L (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a 60°C por 24 h, sob agitação. Então, foram lavados em água deionizada estéril por 1 hora e por fim, esterilizados em autoclave. (CAMARGO *et al.*, 2017; VILA REAL *et al.*, 2021) (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática do tratamento dos discos de titânio com ácido fluorídrico (HF) e alcalinização com NaOH.



Fonte: autor

### 3.3 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE SUPERFICIAIS

A topografia e rugosidade dos discos de titânio polidos, submetidos a diferentes tratamentos, foram avaliadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV; Inspect Scanning Electron Microscope-S50, FEI, Hillsboro, OR, EUA). Após a aquisição das imagens, estas foram analisadas por meio do software Image J (*National Institutes of Health*), a partir do qual foram obtidas 5 áreas lineares de cada imagem. A rugosidade de cada amostra foi considerada a partir da média destas cinco medidas (n=6) (VILA REAL *et al.*, 2022; MOURA *et al.*, 2023) (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática da análise de topografia e rugosidade superficiais por meio de MEV.



Fonte: autor

### 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização dos experimentos, após os protocolos de modificação de superfície, os discos de titânio, foram esterilizados em autoclave e alocados em placas de cultura de células de 24 poços (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática da esterilização dos discos e posicionamento dos discos de titânio alocados, após a esterilização, em placas de 24 poços.



Fonte: autor

### 3.5 ANÁLISE QUALITATIVA DA ADESÃO DO LPS À SUPERFÍCIE DE TITÂNIO

Para determinar o efeito das modificações de superfície na adesão do LPS, após o posicionamento dos discos nas placas de cultura, foi adicionado 1mL de meio de cultura (DMEM) livre de SBF contendo LPS de *E. Coli* (1 $\mu$ g/mL). Para viabilizar a observação do LPS, foi selecionado um LPS acoplado a uma fluoresceína (Thermo Scientific, Carlsbar, CA, EUA). Vinte e quatro horas após a adição do LPS, as amostras foram analisadas por meio de microscopia de fluorescência (Leica RM 2145, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), utilizando os comprimentos de onda de 495/510 nm (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática da aplicação do LPS sobre os discos de titânio e análise qualitativa por meio de microscopia de fluorescência.



Fonte: autor

### 3.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ADESÃO DO LPS À SUPERFÍCIE DE TITÂNIO

A análise quantitativa da adesão do LPS às superfícies de titânio polidos e modificados com tratamento ácido ou alcalino foi realizada por meio da leitura de intensidade de fluorescência de área das diferentes superfícies, utilizando um fluorímetro (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT, EUA), nos comprimentos de onda de 495/510 nm (Figura 7).

Figura 7. Representação esquemática da análise quantitativa da adesão do LPS sobre as superfícies dos discos de titânio.



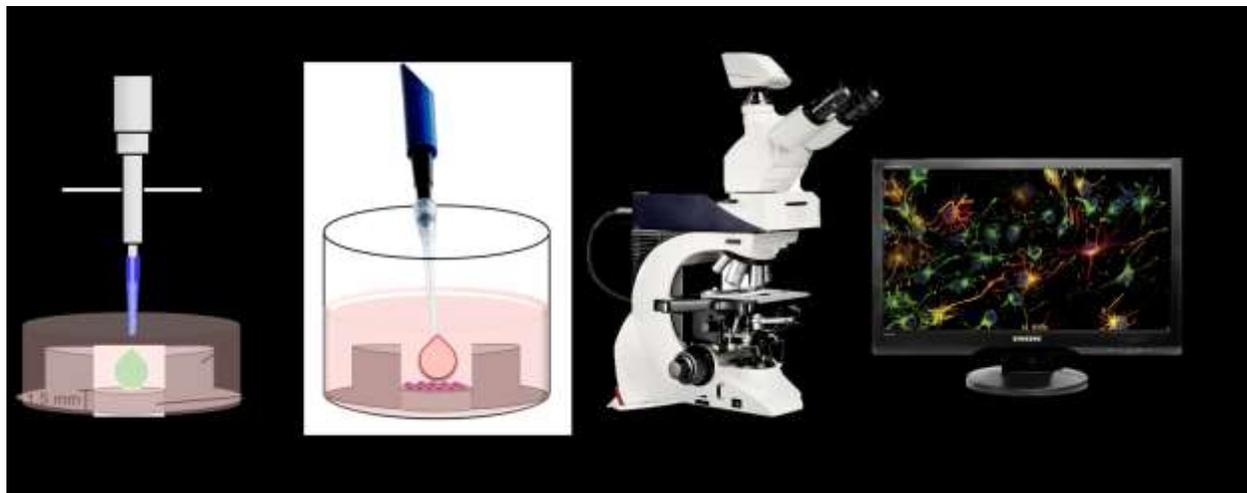
Fonte: autor

### 3.7 ANÁLISE DO EFEITO DAS MODIFICAÇÕES DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO SOBRE A ADESÃO E METABOLISMO DE OSTEÓBLASTOS

Para este estudo, foi selecionada uma linhagem de osteoblastos humanos Saos-2. As células foram mantidas em frascos de cultura celular de 75cm<sup>2</sup> em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium- DMEM (Gibco, Cralbad, CA, EUA) contendo 1% de solução antibiótica (Gibco) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) até que fosse obtida confluência de 80%. Os subcultivos foram realizados utilizando tripsina/EDTA 0,25% (Gibco).

A partir da obtenção do número de células necessário para o experimento, estas foram cultivadas sobre os discos de titânio, previamente alocados em placas de 24 compartimentos, e submetidos ao contato com LPS (1 µg/mL), na densidade de 2x10<sup>4</sup> células por disco em 1mL de meio de cultura completo (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática da análise da adesão dos osteoblastos aos diferentes substratos na presença do LPS.



Fonte: autor

### 3.8 ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR

A adesão dos osteoblastos às superfícies de titânio na presença ou ausência do LPS foi determinada por fluorescência direta, utilizando um marcador de citoesqueleto (Actin Red, Invitrogen, 650 nm) e um intercalante de DNA (Hoescht, Invitrogen) (n=6), após 24 horas de contato.

As células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 min, seguido de lavagem em PBS 1x, permeabilização com Triton x-100 (0,1% - Sigma-Aldrich) e incubação com Actin Red por 30 min. A seguir, as células foram novamente lavadas em tampão fosfato e submetidas a marcação nuclear com Hoescht (1:5000) por 15 min. As amostras foram qualitativamente analisadas por microscopia de fluorescência. Cinco campos de cada amostra foram fotografados e analisados quantitativamente em software ImageJ (Figura 9).

Figura 9. Representação da análise da adesão dos osteoblastos aos diferentes substratos.



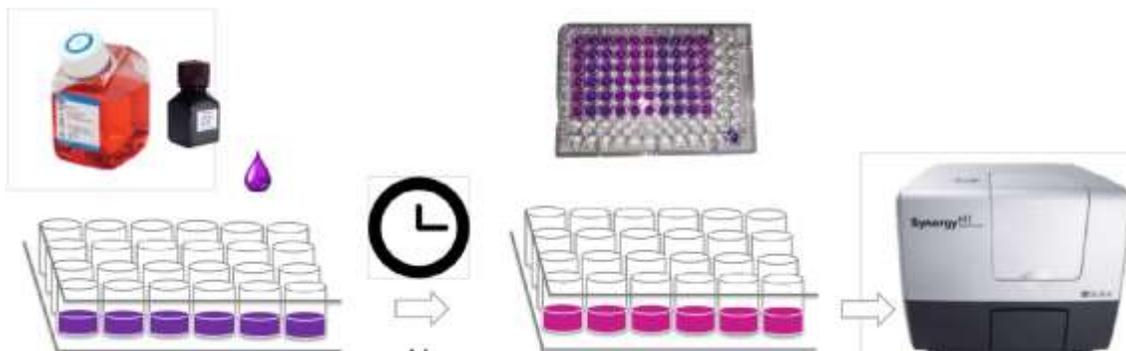
Fonte: autor

### 3.9 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade dos osteoblastos foi avaliada por meio do ensaio de prestoBlue, cujo resultado se dá pela clivagem da resazurina em resufurina, um composto fluorescente.

Após 24 horas do contato com LPS, as células foram incubadas por 1 hora a 37°C em meio de cultura DMEM livre de SFB, contendo 10% de solução de prestoBlue. Após este período, 200 µL da solução foi transferida para uma placa de 96 poços e submetida a análise de intensidade de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1), nos comprimentos de onda de 560/590 nm (Figura 10).

Figura 10. Representação do ensaio de PrestoBlue, para avaliação da viabilidade dos osteoblastos após cultivo sobre diferentes superfícies.



Fonte: autor

### 3.10 ANÁLISE DA SÍNTESE DE TNF- $\alpha$

A síntese de TNF- $\alpha$  pelos osteoblastos nas diferentes condições experimentais foi determinada por meio do imunoenensaio ELISA, utilizando o meio de cultura (sobrenadante) em contato com as células por 24 horas após a exposição ao LPS, utilizando o kit DuoSet humanTNF- $\alpha$  (R&D Systems, EUA, Minneapolis MN, EUA).

Para a realização do ensaio, uma placa de 96 poços específica para tal protocolo foi previamente incubada com o anticorpo primário por 8 horas (overnight) a temperatura ambiente. Após lavagem em “wash solution” 1:25, foi realizado o bloqueio da placa com Reagent Diluent 1:10 por 30 minutos, seguido de lavagem. A seguir, foram adicionados 100uL de cada amostra, além de amostras para curva padrão, que foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, seguido de nova lavagem. Então, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário por 2 horas, seguido de lavagem e adição de Streptavidina, para identificação dos anticorpos conjugados aos antígenos, e incubação por 20 minutos na ausência de luz. Após nova lavagem, foi adicionada a “Substrate Solution” por 20 minutos e, por fim, a “Stop solution”.

A seguir, as amostras foram submetidas a análise de absorbância em espectrofotômetro (450 nm – Synergy H1). A concentração de TNF- $\alpha$  foi determinada por meio de interpolação em curva padrão (Figura 11).

Figura 11. Representação do protocolo de imunoenensaio ELISA, para determinação da concentração de TNF- $\alpha$  no meio de cultura em contato com os osteoblastos durante 24 horas de cultivo.



Fonte: autor

### 3.11 ANÁLISE DOS DADOS

A topografia superficial, a adesão do LPS por microscopia de fluorescência, bem como a adesão dos osteoblastos foram analisados qualitativamente.

Os dados de rugosidade superficial, adesão quantitativa do LPS, viabilidade, e síntese de TNF-alfa foram analisados por meio do teste ANOVA a dois critérios (superfície e presença/ausência de LPS), e pós-teste de Tukey. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância pré-determinado de 5%.

## 4. RESULTADOS

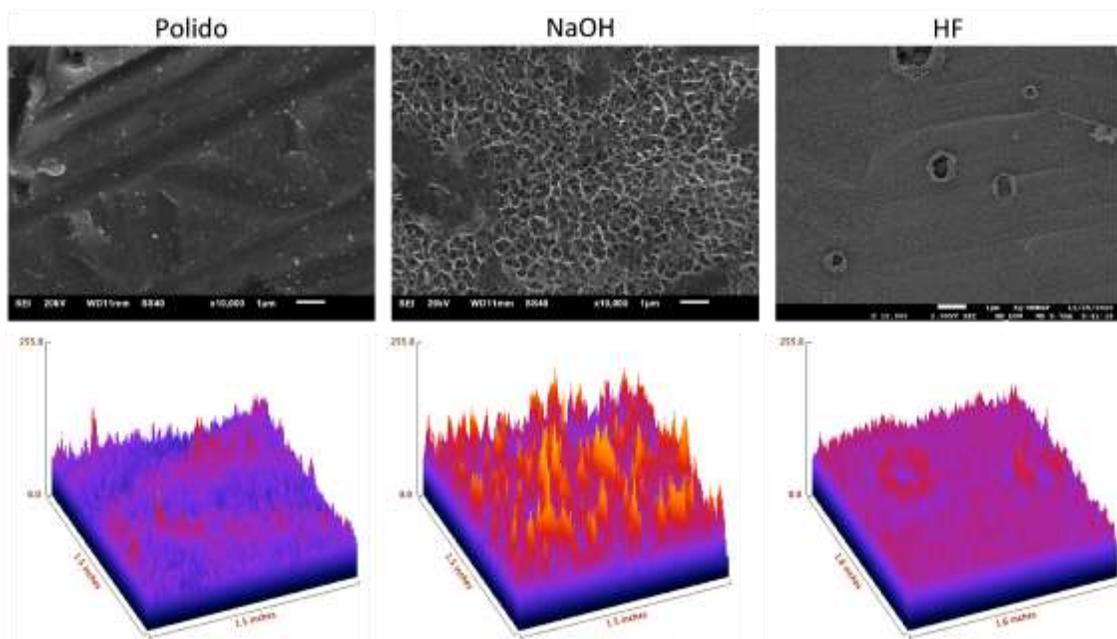
### 4.1 TOPOGRAFIA SUPERFICIAL

A análise das diferentes superfícies de titânio por meio de MEV demonstrou que ambos os tratamentos de superfície resultaram em alterações da topografia dos discos de titânio, resultando aumento da amplitude de picos e vales, conforme demonstrado na Figura 12.

Para os discos polidos, nota-se pouca variação de rugosidade, demonstrados pela imagem tridimensional. Para os discos alcalinizados, é possível observar a presença de microporosidades na superfície, com maior amplitude entre picos e vales.

Os discos submetidos ao tratamento ácido também apresentaram a presença de poros na superfície, observados na análise tridimensional.

Figura 12. Fotomicrografias das amostras de discos de titânio polidos ou submetidos aos diferentes tratamentos de superfície NaOH e HF, por meio de microscopia eletrônica de varredura e análise qualitativa da topografia superficial de cada amostra, analisada por meio do software Image J.

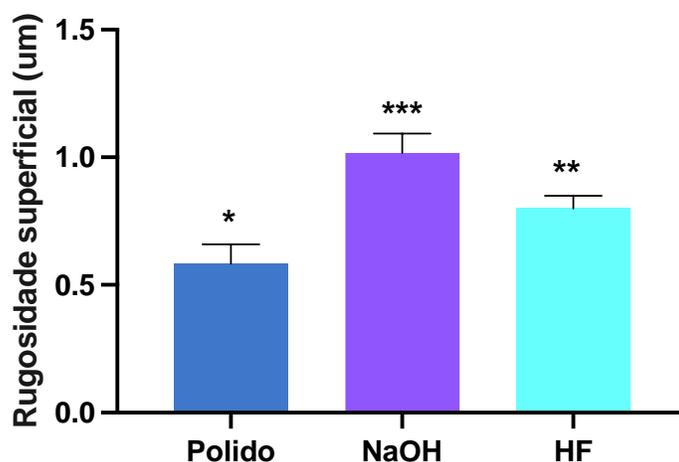


Fonte: autor

## 4.2 RUGOSIDADE SUPERFICIAL

A análise da superfície dos discos de titânio polidos e submetidos ao tratamento de superfície por alcalinização e tratamento ácido demonstrou que ambos os tratamentos resultaram em aumento significativo da rugosidade superficial, sendo que o tratamento alcalino com NaOH provocou maiores alterações desta rugosidade, com aumento de 40%, aproximadamente para os discos alcalinizados e 20% para os tratados com ácido fluorídrico (Figura 13).

Figura 13. Gráfico da rugosidade superficial dos discos polidos e submetidos aos tratamentos por alcalinização por NaOH ou tratamento com ácido fluorídrico.



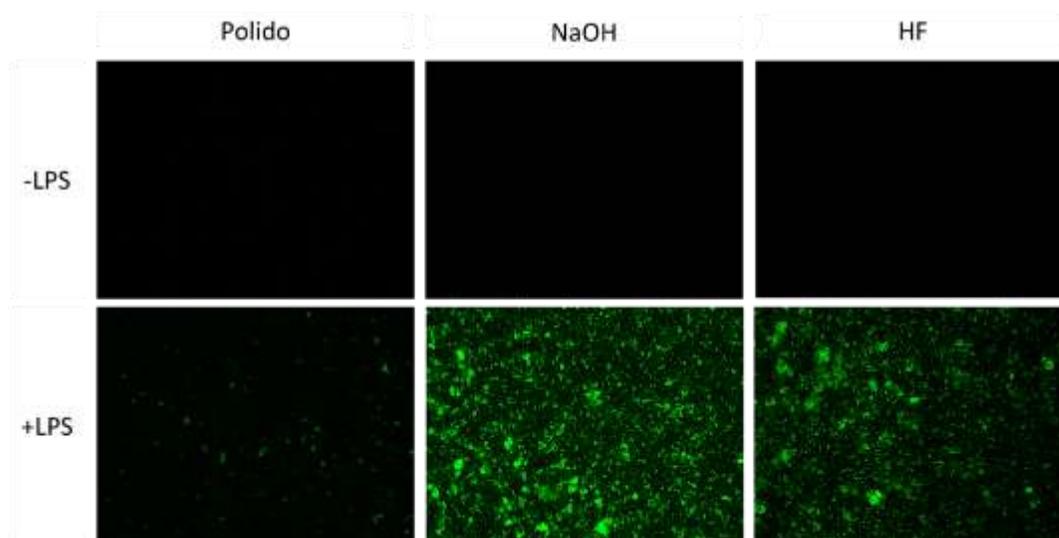
Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significante (Tukey,  $p < 0,05$ ),  $n=6$ .

Fonte: Autor

### 4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA ADESÃO DO LPS AOS SUBSTRATOS

A análise qualitativa da adesão do LPS aos substratos por meio de microscopia de fluorescência, visando observar a distribuição deste produto bacteriano sobre as diferentes superfícies demonstrou que a adesão de LPS foi maior para os discos submetidos aos tratamentos de superfície (Figura 14), como pode ser observado por meio da visualização de diversos pontos fluorescentes nas amostras tratadas, enquanto apenas escassas marcações são identificadas na amostra polida, submetida à incubação com LPS acoplado à sonda fluorescente.

Figura 14. Fotomicrografias da análise da adesão do LPS conjugado a fluoresceína sobre as amostras de discos de titânio polidos ou submetidos aos diferentes tratamentos de superfície, por meio de microscopia de fluorescência (x100).



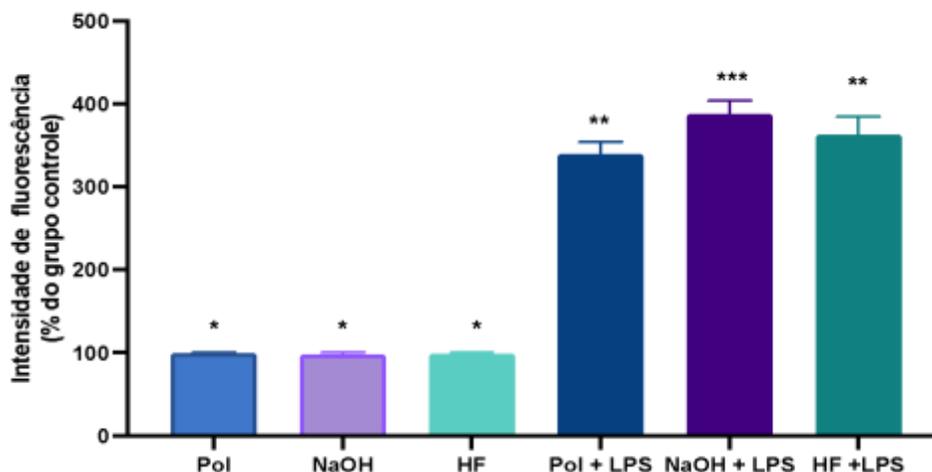
A marcação em verde indica a presença do LPS conjugado a uma fluoresceína sobre as diferentes superfícies.  
Fonte: Autor

### 4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ADESÃO DE LPS À SUPERFÍCIE DE TITÂNIO

A análise quantitativa da adesão do LPS às superfícies por meio de fluorímetro demonstrou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na intensidade de fluorescência para todos os grupos tratados com

LPS, sendo que esta fluorescência foi maior para os discos tratados com NaOH (Figura 15), o que confirma a adesão do LPS às superfícies.

Figura 15. Gráfico da intensidade de fluorescência das amostras de discos de titânio polidos, tratados com hidróxido de sódio ou ácido fluorídrico na ausência e presença do LPS acoplado a uma fluoresceína.



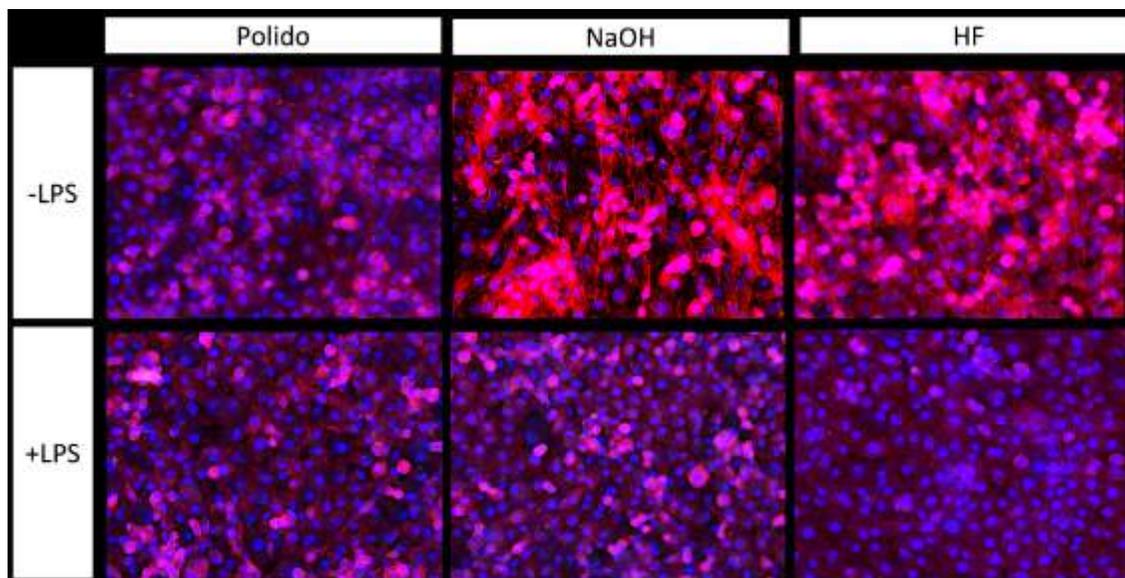
Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Fonte: Autor

#### 4.5 ANÁLISE DA ADESÃO DOS OSTEÓBLASTOS À SUPERFÍCIE DE TITÂNIO

A análise da adesão dos osteoblastos aos substratos de discos de titânio polidos e tratados com hidróxido de sódio ou ácido fluorídrico demonstrou maior número de células aderidas às superfícies submetidas aos tratamentos na ausência de LPS, bem como maior espreadimento celular. Entretanto, quando presente o LPS, observou-se uma diminuição no espreadimento celular, mantendo o número de células constante, conforme identificado pela marcação do DNA por meio do intercalante (Figura 16).

Figura 16. Fotomicrografias das amostras de osteoblastos cultivados sobre discos de titânio polidos ou submetidos aos diferentes tratamentos de superfície, por meio de microscopia de fluorescência.



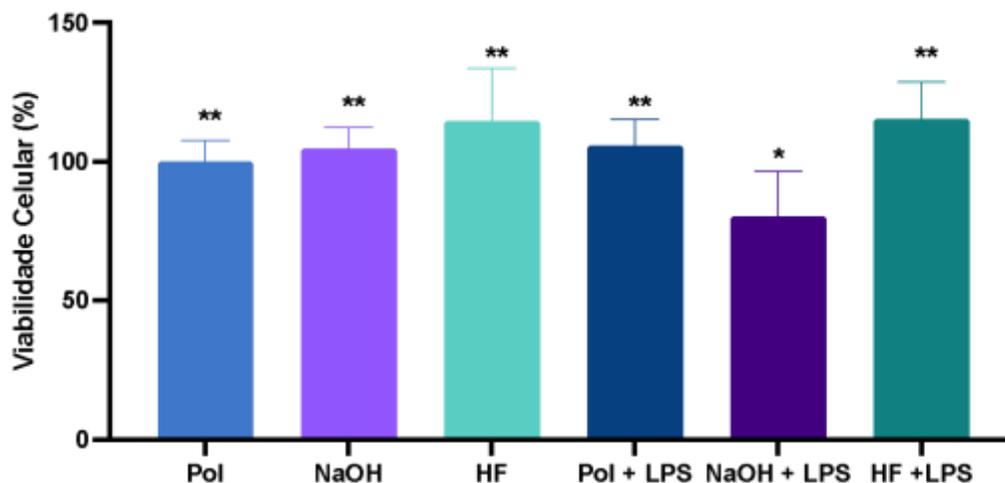
Nas amostras, o citoesqueleto celular pode ser identificado em vermelho (filamentos de actina), enquanto os núcleos estão identificados em azul (DNA) (x100).

Fonte: autor

#### 4.6 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da viabilidade dos osteoblastos semeados sobre os discos de titânio polidos ou submetidos às modificações de superfície demonstrou maior viabilidade para as células cultivadas sobre os discos tratados com HF. Na presença do LPS, houve menor viabilidade para os osteoblastos cultivados sobre os discos alcalinizados (Figura 17).

Figura 17. Viabilidade dos osteoblastos cultivados sobre discos de titânio polidos, tratados com hidróxido de sódio ou ácido fluorídrico na ausência e presença do LPS acoplado a uma fluoresceína.



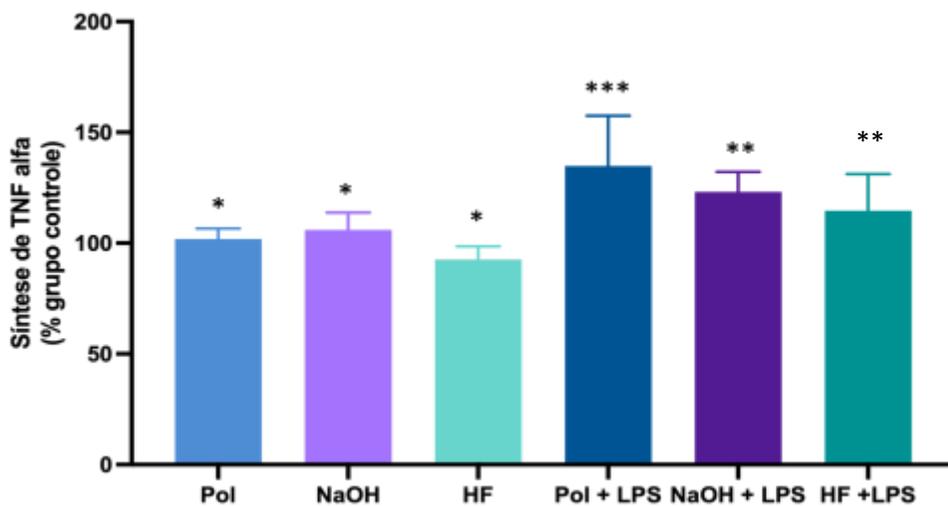
Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Fonte: autor

#### 4.7 ANÁLISE DA SÍNTESE DE TNF- $\alpha$

Na presença do LPS, a síntese de TNF- $\alpha$  foi exacerbada para os osteoblastos cultivados sobre todas as superfícies de titânio, com destaque para os discos polidos, que apresentaram maiores valores dessa síntese ( $p < 0,05$ ), enquanto as células cultivadas sobre os discos submetidos às modificações de superfície apresentaram menor intensidade de resposta ( $p < 0,05$ ) (Figura 18). Os dados de síntese de TNF- $\alpha$  foram normalizados pelos valores de viabilidade celular de cada amostra correspondente.

Figura 18. Síntese de TNF-alfa por osteoblastos cultivados sobre os discos de titânio polidos, tratados com hidróxido de sódio ou ácido fluorídrico na ausência e presença do LPS acoplado a uma fluoresceína.



Barras indicam média e desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ),  $n = 6$ .

Fonte: autor

## 5. DISCUSSÃO

O sucesso da instalação de implantes osseointegrados depende da efetiva ancoragem destes ao tecido ósseo, bem como do selamento mucoso, obtidos a partir da relação direta entre os tecidos peri-implantares e superfície do implante (BRÅNEMARK *et al.*, 1977).

Um estudo demonstrou que a modificação da superfície de implantes de titânio promove aumento da rugosidade e da molhabilidade destas superfícies melhorando também a interação e adesão das células que compõem os tecidos peri-implantares (ZAHARAN *et al.*, 2016), desta forma, é possível favorecer as interações célula-substrato e a osteogênese de contato (FLAMANT *et al.*, 2016; TRENTO *et al.*, 2020). Esses estudos corroboram com os resultados do presente estudo, em que os tratamentos de superfície resultaram em alterações da topografia dos discos de titânio, aumentando significativamente a rugosidade superficial média dos grupos tratados com NaOH e HF quando comparados ao grupo de discos polidos.

Além da influência da topografia e rugosidade superficiais, as diferenças no comportamento celular também ocorrem devido a diferenças químicas das diferentes superfícies, como demonstrado previamente em um estudo de Rupp *et al.* (2014), no qual os autores avaliaram superfícies de mesma topografia, no entanto, com recobrimentos químicos diferentes, sendo que o reparo ósseo foi significativamente diferente entre as superfícies.

A doença peri-implantar é uma condição causada pela presença de placa bacteriana e seus subprodutos na região peri-implantar (ZITZMANN *et al.*, 2001). A placa subgingival é o fator inicial da peri-implantite que é composta de uma comunidade microbiana não mineralizada que adere à superfície do dente ou implante e não pode ser removida com água (SBORDONE; BORTOLAIA, 2003). Em um estudo anterior, os autores demonstraram que muitos microrganismos já foram descritos como fatores etiológicos na doença peri-implantar, principalmente bactérias Gram-negativas e anaeróbias, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* (LAFURIE *et al.*, 2017).

Durante a formação do biofilme temos três tipos de colonizadores, sendo a primeira bactéria colonizadora na formação de placa, a *S. sanguinis* (PERIASAMY; KOLENBRANDER, 2010). A bactéria *Fusobacterium nucleatum* é uma ponte de ligação entre a colonização inicial e tardia, colonizando a superfície no meio da formação da placa. A cepa dominante mais importante durante

a etiopatogênese da peri-implantite é a *Porphyromonas gingivalis*, sendo esta a última colonizadora do biofilme (HAJISHENGALLIS, 2015).

Esses microrganismos possuem um componente externo, os lipopolissacarídeos (LPS), que é formado por uma camada lipídica e duas camadas de açúcar, uma hidrofóbica e outra parte hidrofílica, respectivamente. A composição molecular do LPS é diferente para cada espécie e até mesmo para cepas diferentes, sendo a porção lipídica considerada a responsável pela maior ação imunogênica do LPS (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

Um outro estudo de caso em conjunto com uma revisão sistemática, observou que as bactérias comensais de *E.Coli* foi uma das mais encontradas em falhas precoces de implantes dentários, bem como apresenta uma camada de LPS das mais resistentes aos antibióticos costumeiramente utilizados na prática clínica da implantodontia, se tornando assim o organismo de eleição para o nosso estudo (MEDINA; VILLA-CORREA, 2015).

A presença destes microrganismos e seus sub-produtos, como LPS, resulta na ativação da resposta inflamatória local, cuja progressão ou cronificação está associada a ativação de macrófagos e osteoclastos, responsáveis pela degradação da matriz óssea (OBANDO-PEREDA *et al.*, 2014).

Estudos anteriores demonstraram que o LPS é capaz de aderir fortemente à superfície de titânio (OBANDO-PEREDA *et al.*, 2014), o que pode resultar em efeitos prolongados a este estímulo, mesmo após a remoção do biofilme bacteriano (PETTERSSON *et al.*, 2019). No presente estudo, houve adesão do LPS em todas as superfícies avaliadas, no entanto, esta adesão foi maior para os discos submetidos aos tratamentos de superfície, sendo mais significativa nos discos tratados com NaOH. Estes resultados podem estar associados à maior rugosidade das superfícies tratadas, o que facilita a adesão inicial dos produtos bacterianos.

Este fato pode também ser resultado de maior interação destas superfícies com compostos orgânicos. Estudos também demonstraram que a alcalinização de superfícies de titânio facilita a adsorção de moléculas orgânicas como fatores de crescimento e outros compostos (KOKUBO *et al.*, 2004; PANSANI *et al.*, 2021). No entanto, no presente estudo, este fator apresentou uma face negativa, facilitando também a adesão do LPS. Este efeito poderia ser contraposto pela adsorção/impregnação de produtos antibacterianos (BARÃO *et al.*, 2022). Em contrapartida, um

estudo anterior demonstrou efetividade antibacteriana na modificação de superfícies de titânio por NaOH na concentração de 10 M (LIJNEV *et al.*, 2023). No entanto, esta concentração resultou na redução da adesão e proliferação celular.

Ainda, a menor adesão de LPS na superfície tratada com ácido fluorídrico, foi observada comparada a superfície tratada com NaOH, podendo ser resultado da formação de áreas hidrofóbicas após o tratamento com HF, o que, segundo estudos anteriores, reduz a adesão do LPS (SCHMIDLIN *et al.*, 2013; KLIGMAN *et al.*, 2021).

A análise da adesão dos osteoblastos aos substratos de discos de titânio polidos e tratados com NaOH e ácido fluorídrico demonstrou maior número de células aderidas para as superfícies submetidas aos tratamentos com NaOH e HF na ausência de LPS. No entanto, na presença do LPS, houve menor espraiamento celular. A adesão celular é diretamente influenciada pelo tipo de substrato, bem como pela topografia do mesmo. Diversos estudos já demonstraram que uma maior rugosidade resulta em aumento da superfície de contato e elevação na adesão e espraiamento de células mesenquimais, como os osteoblastos (VILA REAL *et al.*, 2022; STOILOV *et al.*, 2022; INCHINGOLO *et al.*, 2023), corroborando os dados do presente estudo.

Como relatado anteriormente, a maior rugosidade resultante dos tratamentos de superfície também resultou em aumento da adesão do LPS, o que pode sugerir uma maior susceptibilidade para formação de biofilmes sobre estas superfícies. A presença do LPS, que neste estudo representa uma potencial infecção bacteriana, pode, todavia, interferir fisicamente na adesão destas células, cujo biofilme pode competir pelo substrato, ou ainda interferir bioquimicamente, de forma a prejudicar a expressão de integrinas e outros compostos da superfície celular.

A viabilidade dos osteoblastos foi positivamente influenciada pelas modificações de superfície, sendo que para ambos os tratamentos houve aumento significativo desta viabilidade. Esse resultado está diretamente relacionado à topografia das superfícies avaliadas, visto que o aumento de rugosidade causado pelas modificações com NaOH e HF melhoram a adesão e também o metabolismo das células mesenquimais (REAL *et al.*, 2022; STOILOV *et al.*, 2022; INCHINGOLO *et al.*, 2023). No entanto, na presença do LPS, assim como observado para a adesão celular, a viabilidade foi prejudicada, indicando uma toxicidade direta ou ainda uma competição pelo substrato.

A síntese de citocinas inflamatórias por células responsáveis pelo reparo peri-implantar também está diretamente relacionada à resposta tecidual frente a um estímulo inflamatório. A síntese de TNF-alfa resulta em recrutamento de células inflamatórias, que fagocitam periodontopatógenos, além de atuar como *feedback* positivo na síntese de outros mediadores inflamatórios. No entanto, em altas concentrações, essa citocina pode desencadear fatores reguladores da atividade colagenolítica e da reabsorção óssea. Portanto, a modulação desta resposta pode ser interessante no reparo e homeostasia dos tecidos peri-implantares. (ZITZMANN, N.U. *et al.*, 2001).

Neste estudo, a síntese de TNF-alfa foi menor para as superfícies submetidas aos tratamentos de superfície, tanto com NaOH quanto com HF, mesmo na presença do estímulo inflamatório (LPS). Esta resposta celular pode estar associada a uma melhor adesão a estes substratos, o que regula indiretamente o fluxo intracelular melhorando a síntese proteica e a diferenciação celular.

As pesquisas na área de biomateriais para uso em implantes odontológicos têm direcionado seus esforços na busca de uma superfície que promova osseointegração rápida e duradoura (SAMMONS *et al.*, 2005). O grande desafio nesta área de pesquisa é o desenvolvimento de uma superfície que promova aceleração na osseointegração, considerando todas as particularidades biológicas de cada indivíduo.

Sabe-se que existe uma relação direta entre a superfície do implante e a osseointegração e que este fenômeno está diretamente ligado ao tipo ou tratamento aplicado à superfície do implante (SMEETS *et al.*, 2016).

Temos como exemplo, pacientes diabéticos que possuem o sistema de defesa comprometidos mantendo uma maior quantidade de bactérias resistentes (ou bactérias que o corpo não consegue combater), sendo necessário, uma superfície que ofereça uma maior adesão celular além de uma menor adesão bacteriana, concluindo que a análise da superfície deve ser feita considerando não somente a osseointegração, mas sim a osseointegração somada a condição do paciente, para o melhor resultado do tratamento.

Uma análise cuidadosa das superfícies é fundamental, uma vez que as modificações realizadas podem afetar não só a rugosidade, mas também as propriedades físicas e químicas da

mesma. É importante considerar não apenas a osseointegração, mas também como essas alterações podem afetar a adesão de bactérias.

## 6. CONCLUSÃO

A modificação da superfície de titânio por meio de acidificação com ácido fluorídrico e da alcalinização com hidróxido de sódio resultou em aumento significativo da adesão de LPS de *E. coli* quando estas superfícies foram comparadas com o titânio polido. Ademais, tivemos também como resultado, o aumento da adesão de osteoblastos humanos (SaOs-2) na ausência de LPS, enquanto que na presença de LPS de *E. coli* esta adesão foi prejudicada.

De modo geral, a superfície submetida ao tratamento com HF promoveu menor interação ao LPS, além de promover a manutenção da viabilidade dos osteoblastos e a modulação da síntese do fator de necrose tumoral alfa.

A análise da superfície dos discos de Ti polidos e submetidos ao tratamento de superfície por alcalinização e tratamento ácido demonstrou que ambos os tratamentos resultaram em aumento significativo da rugosidade superficial, sendo que o tratamento alcalino com NaOH provocou maiores alterações desta rugosidade.

Estas mesmas modificações, resultaram em redução da viabilidade para os osteoblastos cultivados sobre as superfícies tratadas com NaOH na presença do LPS, enquanto os outros grupos apresentaram viabilidade semelhante ao grupo de discos polidos.

Em relação a síntese de TNF- $\alpha$ , as modificações resultaram em aumento da síntese de fator de necrose tumoral alfa por osteoblastos humanos (SaOs-2) na presença do LPS, sendo esta síntese menor para as células cultivadas sobre os discos tratados com HF.

## REFERÊNCIAS

ALBREKTSSON, T.; DAHLIN, C.; JEMT, T.; SENNERBY, L.; TURRI, A.; WENNERBER, G. A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? **Clin Implant Dent Relat Res.** 2014 Apr. Epub 2013.

ATABEK, A.; LIU, Y.; PINZÓN-ARANGO, P.A.; CAMESANO, T.A. Importance of LPS structure on protein interactions with *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces.* v.67, p.115-121, 2008.

BARÃO, V.A.R.; COSTA, R.C.; SHIBLI, J.A.; BERTLINI, M.; OUZA, J.G.S. Emerging titanium surface modifications: the war against polymicrobial infections on dental implants. **Brazilian Dental Journal.** v.33, p.1-12, 2022.

BRÅNEMARK, P. I.; HANSSON, B. O. ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; HALLÉN, O. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstruction Surgery - Supplementum** v. 16, p. 1-132, 1977.

CAI, K.; BOSSERT, J.; JANDT KD. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? **Colloids and Surfaces: B Biomaterials**, v. 49, p. 136-144, 2006.

CAMARGO, W. A., TAKEMOTO, S; HOEKSTRA, J. W., LEEUWENBURGH, S., JANSEN, J. A., VAN DEN BEUCKEN, J., & ALGHAMDI, H. S. Effect of surface alkali-based treatment of titanium implants on ability to promote in vitro mineralization and in vivo bone formation. **Acta Biomaterialia.**, v. 57, p. 51-523, 2017.

CARDOSO LM, PANSANI TN, DE SOUZA COSTA CA, BASSO FG. Naringenin and proanthocyanidins pre-treatment decreases synthesis and activity of gelatinases induced by zoledronic acid in a dental implant surface in vitro model. **Arch Oral Biol.** p. 151, 2023.

DURACCIO, DONATELLA, FEDERICO MUSSANO AND MARIA GIULIA FAGA. Biomaterials for dental implants: current and future trends. **Journal of Materials Science.** v. 50, p. 4779-4812, 2015.

DYE BA, THORNTON-EVANS G, LI X, IAFOLLA TJ. Dental caries and tooth loss in adults in the United States, 2011–2012. **National Center for Health Statistics**. Data Brief N°. 197, May 2015. <https://www.cdc.gov/nchs/products/databriefs/db197.htm>. Acesso em 15 de Outubro de 2023.

ENGEL, E.; MICHIARDI, A.; NAVARRO, M.; LACROIX, D.; & PLANELL, J. A. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. **Trends in Biotechnology**., v. 26, n. 1, p.39-47, 2008.

FLAMANT, Q.; MARRO, F.G.; ROVIRA, J.J.; ANGLADA, M. Hydrofluoric acid etching of dental zirconia. Part 1: etching mechanism and surface characterization. **Journal of European Ceramics**, v. 36, n. 1, p. 121-34, 2016.

GOMES RFT, CASTELO EF. Hospital dentistry and the occurrence of pneumonia. RGO, **Rev Gaúch Odontol**. p. 67. 2019.

HAJISHENGALLIS G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 15, p. 30-44, 2015.

HAN KH, LEE JY, SHIN SW. Implant- and Tooth-Supported Fixed Prosthesis Using a High-Performance Polymer (Pekkton) Framework. **Int Journal Prosthodont**. v. 29, p. 451-454, 2016.

HICKOK, NJ; SHAPIRO, IM; CHEN, AF. The impact of incorporating antimicrobials into implant surfaces. **Journal of Dental Research**.v.97, p.14-22, 2018.

INCHINGOLO, A.M.; MALCANGI, G.; FERRANTE, L.; DEL VECCHIO, G.; VIAPIANO, F.; INCHINGOLO, A.F. et al. Surface coatings of dental implants: a review. **Journal of Functional Biomaterials**. v. 14, p.287 – 305, 2023.

JAVED F, ROMANOS GE. The role of primary stability for successful immediate loading of dental implants. A literature review. **Journal Dent**. v. 38, p. 612-620, 2010.

KARTHIK, K.; SIVARAJ, S.; THANGASWAMY, V.. Assessing implant success: A review of past and present concepts **Journal of Pharmacology and Bioalied Sciences** v. 5, p.117–119,2013.

KAWAI, T.; TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; AKIYAMA, H.; YAMAGUCHI, S.; PATTANAYAK, D.K.; MATSUSHITA, T.; NAKAMURA, T.; KOKUBO, T. Bone-bonding properties of Ti metal subjected to acid and heat treatments. **Journal of Materials Sciences and Materials in Medicine**. v.23, p.2981-2992, 2012.

KLINGMAN, S.; REN, Z.; CHUNG, C.; PERILLO, M.A.; CHANG, Y.; KOO, H. ZHENG, Z.; LI, c. The impact of dental implant surface modifications on osseointegration and biofilm formation. **Jounal of Clinical Medicine**. v.10, p.1641-1676, 2021.

KOKUBO, T.; KIM, H.-M.; KAWASHITA, M.; NAKAMURA, T. REVIEW Bioactive metals: preparation and properties. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 2, p. 99-107, 2004.

KULLAR, A. S.; MILLER, C. S. Are there contraindications for placing dental implants? **Dental Clinics of North America**, v. 63, p. 345-362, 2019.

LAFaurIE, G.I.; SABOLGAL, M.A.; CASTILLO, D.M.; RINCÓN, M.V.; GÓMEZ, L.A.; LESMES, Y.A.; CHAMBRONE, L. Microbiome and microbialbiofilm profiles of peri-implantitis: a systematic review. **Journal of Periodontology**, v. 88, p. 1066 – 1089, 2017.

LAU, P.C.Y.; LINDHOUT, T.; BEVERIDGE, T.J.; DUYSCHER, J.R.; LAM, J.S. Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*. v. 191; p. 6618 – 6631, 2009.

LINJEV A.; ELANG, J.; GOMEZ-LOPEZ, V.M.; MARTINEZ, C.P., MARIN, J.M.G.; DE VAL, J.E.M.S. Antibacterial and proliferative effects of NaOH-coated titanium, zirconia, and ceramic-reinforced PEEK dental composites on bone marrow mesenchymal cells. **Pharmaceutics**. V.15, p.98-105, 2023.

MEDINA CMA, VILLA-CORREA YA. Gram-negative enteric rods associated to early implant failure and peri-implantitis: Case report and systematic literature review. **Int Journal Odontostomat.**, v. 9, p. 329–336, 2015.

MIAO, X.; WANG, D.; XU, L.; WANG, J.; ZENG, D.; LIN, S.; HUANG, C.; LIU, X.; JIANG, X. The response of human osteoblasts, epithelial cells, fibroblasts, macrophages and oral bacteria to nanostructured titanium surfaces: a systematic study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1415- 1430, 2017.

MOHAMMAD-RAHIMI H, MOTAMEDIAN SR, PIRAYESH Z, HAIAT A, ZAHEDROZEGAR S, MAHMOUDINIA E, ROHBAN MH, KROIS J, LEE JH, SCHWENDICKE F. Deep learning in periodontology and oral implantology: A scoping review. **J Periodontal Res**. 2022.

MOMBELLI A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. **Periodontol**. 2000.

MOURA NETO, J.; CARDOSO, L.M.; PANSANI, T.N.; RAUCCI, L.M.S.C.; DE SOUZA COSTA, C.E.; BASSO, F.G. Influence of titanium and zirconia substrates on the synthesis of inflammatory mediators. **Biointerphases**. V.18, p.41, 2023.

NISHIGUCHI, S.; FUJIBAYASHI, S.; KIM, H. M.; KOKUBO, T.; & NAKAMURA. T Biology of alkali-and heat- treated titanium implants, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 67, p. 26-35, 2003.

NOCITI JR. F.H, TOLEDO R.C, MACHADO M.A.N, STEFANI C.M, LINE S. R. P., GONÇALVES R. B. Clinical and micro-biological evaluation of ligature-induced periodontitis in dogs. **Clin Oral Implants Res**. v. 12, p. 295-300, 2001.

NOUNEH, R.A.; WATAHA, J.C.; HANES, P.J.; LOCKWOOD, P.E. Effect of lipopolysaccharide contamination on the attachment of osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy in vitro. **Journal of Oral Implantology**. V.27, p.174-179, 2001.

OBANDO-PEREDA, G.A.; FISCHER, L.; STACH-MACHADO, D.R. Titanium And Zirconia Particle-Induced Pro-Inflammatory Gene Expression In Cultured Macrophages And Osteolysis, Inflammatory Hyperalgesia And Edema In Vivo. **Life Sciences**, v. 97, n. 2, p. 96-106, 2014.

OTTRIA L, LAURITANO D, ANDREASI BASSI M, PALMIERI A, CANDOTTO V, TAGLIABUE A, TETTAMANTI L. Mechanical, chemical and biological aspects of titanium and titanium alloys in implant dentistry. **Journal Biol Regul Homeost Agents**. v. 32, p. 1-90, 2018.

PULENDRAN, B.; KUMAR, P.; CUTLER, C.W.; MOHARAMZADEH M.; VAN DYKE, T.; BANCEREAU, J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. **Journal of Immunology**. v. 167, p. 5067-5076, 2001.

PANSANI, T. N.; PHAN, T. H.; LEI, Q.; KONDYURIN, A.; KALIONIS, B.; CHRZANOWSKI, W. Extracellular Vesicle-Based Coatings Enhance Bioactivity of Titanium Implants: surfev. **Nanomaterials**, v. 11, n. 6, p. 1445, 2021.

PANSANI TN, BASSO FG, CARDOSO LM, DE SOUZA COSTA CA. EGF coating of titanium surfaces modulates cytokines in oral mucosal primary cells exposed to TNF- $\alpha$ . **Journal Periodontal Res**. p. 791-799, 2023.

PARK JH, OLIVARES-NAVARRETE R, BAIER RE, MEYER AE, TANNENBAUM R, BOYAN BD, SCHWARTZ Z. Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. **Acta Biomater**, v. 8, p. 1966-1975, 2012.

PERIASAMY S, KOLENBRANDER PE. Central role of the early colonizer *Veillonella* sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. **Journal Bacteriol**, v. 192, p. 2965-2972, 2010.

PETTERSSON, M.; PETTERSSON, J.; JOHANSSON, A.; MOLIN THORÉN, M. Titanium Release In Peri-Implantitis. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 46, n. 2, p. 179-188, 2019.

RAETZ CR, WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem.**, v. 71, pg. 635-700, 2002.

RAMS, T. E.; DEGENER, J. E. & VAN WINKELHOFF, A. J. Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 25, p. 82-90, 2014.

ROMANOS, GE.; DELGADO, RUIZ, R.; SCULEAN, A. Concepts for prevention of complications in implant therapy. **Periodontology**, v. 81, p. 7-17, 2019.

ROSENBERG ES, TOROSIAN JP, SLOTS J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 2, p. 135-144, 1991.

RUPP F., GITTENS RA, SCHEIDELER L, HYZY SL, GEIS-GERSTORFER J, SCHWARTZ Z, BOYAN BD. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. **Acta Biomater**, v. 10, p. 2907-18, 2014.

SAMMONS RL, LUMBIKANONDA N, GROSS M, CANTZLER P. Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration. A scanning electron microscopic study. **Clin Oral Implants Res**, v. 16, p. 657-66, 2005.

SBORDONE L, BORTOLAIA C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. **Clin Oral Investig**, v. 7, p. 181-188, 2003.

SCHIMIDLIN P.R.; MÜLLER, P.; ATTIN, T.; WIELAND, M.; HOFFER, D.; GUGGENHEIM, B. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. **Journal of Applied Oral Sciences**, v. 21, p.48-55, 2013.

SIMON BI, GOLDMAN HM, RUBEN MP, BAKER E. The role of endotoxin in periodontal disease. III. Correlation of the amount of endotoxin in human gingival exudate with the histologic degree of inflammation. **Journal of Periodontology**.v.42, p.210-216, 1971.

SIVARAMAN K, CHOPRA A, NARAYAN AI, BALAKRISHNAN D. Is zirconia a viable alternative to titanium for oral implant? A critical review. **Journal Prosthodont Res**. v. 62, p. 121-133, 2018.

SMEETS R, STADLINGER B, SCHWARZ F, BECK-BROICHSITTER B, JUNG O, PRECHT C, KLOSS F, GRÖBE A, HEILAND M, EBKER T. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. **Biomed Res Int**. 2016.

STOILOV, M.; STOILOV, L.; ENKLING, N.; STARK, H.; WINTER, J.; MARDER, M.; KRAUS, D. Effects of different titanium surface treatments on adhesion, proliferation and

differentiation of bone cells: an in vitro study. **Journal of Functional Biomaterials**. V. 13, p.143-159, 2022.

STRICKER A, BERGFELDT T, FRETWURST T, ADDISON O, SCHMELZEISEN R, ROTHWEILER R, NELSON K, GROSS C. Impurities in commercial titanium dental implants - A mass and optical emission spectrometry elemental analysis. *Dent Mater*. v. 8, p. 1395-1403, 2022.

TEUGHELS, W.; VAN ASSCHE, N.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clinical Oral Implant Research**, p. 68-81, v. 17, 2006.

TRENTO, G.; DE A. CARVALHO, P. H.; DE C. REIS, E. N. R.; SPIN-NETO, R.; BASSI, A. P. F.; PEREIRA-FILHO, V. A. Bone formation around two titanium implant surfaces placed in bone defects with and without a bone substitute material: A histological, histomorphometric, and micro-computed tomography evaluation. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 22, n. 2 p. 177 - 185, 2020.

TUGULU, S.; LÖWE, K.; SCHARNWEBER, D.; SCHLOTTIG, F. Preparation of superhydrophilic microrough titanium implant surfaces by alkali treatment. **Journal of Materials Science ± Materials in Medicine**, v. 21, p. 2751±2763, 2010.

VILA REAL, R.P.; PANSANI, T.N.; CARDOSO, L.M., DE SOUZA COSTA, C.A.; BASSO FG. Titanium alkalization improves response of osteoblasts to zoledronic acid. **Biointerphases**, 2022, 26, 031004.

WENNERBERG A, ALBREKTSSON T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review, **Clinical Oral Implant Research**, v.20, p.172± 184, 2009.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON ,T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v.25, n.1, p. 63-74, 2010.

WENNERBERG A , ALBREKTSSON T , CHRCANOVIC B. Resultado clínico a longo prazo de implantes com diferentes modificações de superfície . **Eur J Implantol Oral**. 11 (suplemento 1 ): S123 - S136, 2018.

ZAHNAN, R.; LEAL, J.I.R.; VALVERDE, M.A.R. Effect of hydrofluoric acid etching time on titanium topography, chemistry, wettability, and cell adhesion. **PLoS One**. v. 11, n. 11, p.e 0165296, 2016.

ZENG, Y.; YANG, Y.; CHEN, L. Optimized surface characteristics and enhanced in vivo osseointegration of alkali-treated titanium with nanonetwork structures. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, p.1127 - 1142, 2019.

ZITZMANN, N.U.; BERGLUNDH, T., MARINELLO, C.P.; LINDHE, J. Experimental peri-implant mucositis in man. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, p. 517– 523, 2001.