RAISSA MONTEIRO PADALKO

Avaliação da citotoxicidade de filmes antimicrobianos nanoestruturados em discos de titânio: análise em cultura de fibroblastos

São Paulo
2020

RAISSA MONTEIRO PADALKO

Avaliação da citotoxicidade de filmes antimicrobianos nanoestruturados em discos de titânio: análise em cultura de fibroblastos

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Reabilitação em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Padalko, Raissa Monteiro.
Avaliação da citotoxicidade de filmes antimicrobianos nanoestruturados em discos de titânio: análise em cultura de fibroblastos / Raissa Monteiro Padalko; orientador Rodney Garcia Rocha -- São Paulo, 2020.
71 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Reabilitação em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Integrada – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão corrigida

1. Peri-implantite. 2. Fibroblastos. 3. Filmes nanoestruturados. 4. Prata. I. Rocha, Rodney Garcia. II. Título.

Padalko RM. Avaliação da citotoxicidade de filmes antimicrobianos nanoestruturados em discos de titânio: análise em cultura de fibroblastos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 03/03/2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Marcelo Munhóes Romano

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Victor Elias Arana-Chavez

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Talita Girio Carnaval

Instituição: Associação Brasileira de Odontologia Julgamento: Aprovada

AGRADECIMENTOS

À **FOUSP** ao apoio e infraestruturas fornecidas durante toda a graduação e mestrado.

Aos **professores da FOUSP** que colaboraram com a minha formação acadêmica e aos **professores da clínica integrada** por todo o apoio, aprendizado e companhia durante toda a pós-graduação: **Prof. Dr. Alexandre Llanos, Profa. Dra. Carina Domaneschi, Profa. Dra. Inês Aparecida Buscariolo, Profa. Dra. Isabel de Freitas Peixoto, Prof. Dr. José Leonardo Simone, Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti Luchetti, Profa., Prof. Dr. Waldyr Antônio Jorge e Profa. Dra. Sibele Sarti Penha.** Em especial ao **Prof. Dr. Flavio Eduardo Guillin Perez** *(in memoriam),* pelos ensinamentos durante as monitorias nas clínicas semanais.

Aos **pacientes da FOUSP** que foram essenciais para a realização desse estudo e de tantos outros, colaborando diariamente para o desenvolvimento da pesquisa em Odontologia.

Aos **alunos da FOUSP** que confiaram a mim a tarefa de auxiliá-los durante sua trajetória na clínica integrada e ao mesmo tempo me possibilitaram aprender tanto sobre a arte de ensinar.

Ao meu querido **orientador Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha**, que desde a graduação foi uma inspiração para mim com seu jeito didático e amável de lecionar, agradeço por todo o apoio e incentivo em todo o percurso.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Munhóes Romano** por estar sempre disponível para me ajudar, por acreditar na minha capacidade de conclusão desse estudo e por me incentivar diante das dificuldades. Sempre serei grata por tudo que me ensinou e por ser uma inspiração na sala de aula e na clínica para mim, o mundo precisa de mais profissionais dedicados assim.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Adde** por ter sido um professor tão querido quando estava cursando a disciplina de Clínica Integrada em minha graduação que me despertou o interesse pela área acadêmica e apoiou meu ingresso no Mestrado.

Ao **Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez** e ao **Laboratório de Biologia Oral** por todos os recursos disponibilizados e suporte técnico-científico. Obrigada por sempre se mostrar tão acessível e colaborar para que meus dias nos laboratórios fossem tão agradáveis. Obrigada por ser um exemplo de professor que se dedica à pesquisa.

À **Elisângela Chinen**, técnica do laboratório de pesquisa pelo suporte e pela ajuda diária. Você não sabe o quanto seu apoio foi essencial para esse estudo e para o meu crescimento como pesquisadora. Obrigada por ser sempre tão acessível, proativa e paciente, e por simplificar tudo que parecia impossível de se realizar.

À **Roberta Bueno Machado de Campos** por compartilhar comigo cada momento desse processo, pelas aflições nos momentos de dificuldades, pelas noites mal dormidas em frente ao computador e pelos momentos de comemoração após as vitórias. Se não fosse por você, com certeza, não teria acreditado na minha capacidade de concluir esse projeto e eu agradeço todos os dias pela nossa amizade.

À **Priscila Lucena Mendes** por também compartilhar diariamente comigo essa trajetória e compartilhar aprendizados. Você é uma pessoa linda e torço muito pelo seu sucesso profissional.

Aos colegas **Bruno Klouczek, Raquel Gutierrez, Stella Agra e Thais Lage** pelo aprendizado e apoio.

Às empresas **SIN Implantes® e Nanox Tecnologia S.A.®** pela parceria e recursos fornecidos para que esse estudo fosse possível. É graças a empresas como essas que a Odontologia do Brasil tem se aprimorado e se tornado cada vez mais reconhecida.

Agradeço à **CAPES** pelo suporte financeiro na forma da bolsa de mestrado, que possibilitou minha dedicação à pesquisa durante esse período.

Ao meu marido, **Ziad,** por todo o incentivo até a conclusão desse estudo e por sempre me apoiar e acreditar em mim em qualquer novo projeto que quero abraçar, meu amor, companheiro e amigo.

A minha mãe, **Claudia**, por ser minha maior inspiração na Odontologia. Obrigada por ter me formado nessa profissão linda e por abrir mão de tanta coisa para que eu chegasse até aqui. Espero um dia ser um exemplo de mãe como você.

Ao meu pai, **Nicolay**, por ser meu maior incentivador a vida toda e um exemplo de pessoa tanto no âmbito pessoal quanto profissional, sempre dedicado a se reinventar e aprender cada vez mais, isso me inspira a buscar cada vez mais aprimoramento. Obrigada por ter me trazido até aqui.

Aos meus irmãos, **Ivan e Nicole**, **familiares e amigos queridos** por todo incentivo e apoio durante minha pós-graduação.

Finalmente, agradeço a **Deus**, pois sem Ele nada existiria.

“Frequentemente é necessário ter mais coragem para ousar fazer certo do que temer fazer errado”.

(Abraham Lincoln).

RESUMO

Padalko RM. Avaliação da citotoxicidade de filmes antimicrobianos nanoestruturados em discos de titânio: análise em cultura de fibroblastos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

As doenças peri-implantares apresentam-se como o novo desafio da Implantodontia. Devido sua alta prevalência e grandes dificuldades no tratamento, estudos sobre alternativas preventivas poderiam trazer grande contribuição. Desta forma estudamos a aplicação de um filme antimicrobiano contendo prata em componentes protéticos dos implantes dentários. Para encontrar um equilíbrio entre efeito antimicrobiano e toxicidade, propusemos a avaliação da citotoxidade deste filme com diferentes concentrações do agente antimicrobiano, aplicados a discos de titânio, diante de cultura primária de fibroblastos. Portanto, no presente estudo investigamos a citotoxicidade de filmes nanoestruturados em discos de titânio diante de cultura primária de fibroblastos, visando desenvolver um material antimicrobiano e biocompatível capaz de impedir a colonização bacteriana em áreas reabilitadas por implantes. As culturas foram divididas nos seguintes grupos: Grupo A (controle): discos de titânio sem deposição de prata; Grupo B (teste): discos de titânio com uma camada de deposição de solução coloidal de prata e sílica, Grupo C (teste): discos de titânio com o dobro de deposição de solução coloidal de prata em relação ao grupo B, e Grupo D (teste): discos de titânio extra polidos com deposição de uma camada de solução coloidal de prata. Para a análise de citotoxicidade, os materiais foram cultivados com fibroblastos e analisados através de ensaios de citotoxicidade direta (MTT) com período de 24h, 48h e 72h de incubação buscando determinar a taxa de proliferação e viabilidade celular. Para o controle estrutural foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) após 24h de incubação. As amostras não se apresentaram como citotóxicas e novos estudos deverão ser realizados visando resultados in vivo para uma possível aplicação do revestimento em componentes protéticos de implantes.

Palavras-chave: Periimplantite. Fibroblastos. Filmes nanoestruturados. Prata.

ABSTRACT

Padalko RM. Cytotoxicity evaluation of nanostructured antimicrobial films on titanium discs used for dental implant prosthetic components: analysis in fibroblast culture [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Peri-implant diseases present themselves as the new challenge of Implantology. Due to its high prevalence and great difficulties in treatment, studies on preventive alternatives could make a major contribution. We studied the application of an antimicrobial film containing silver in prosthetic components of dental implants. In order to find a balance between antimicrobial effect and toxicity, we proposed to evaluate the cytotoxicity of this film with different antimicrobial agent concentrations applied to titanium discs, facing a primary fibroblast culture. Therefore, in the present study we investigated the cytotoxicity of nanostructured films on titanium discs facing primary fibroblast culture, aiming to develop a biocompatible antimicrobial material capable of preventing bacterial colonization in implant-rehabilitated areas. The cultures were divided into the following groups: Group A (control): titanium discs without silver deposition; Group B (test): titanium discs with a deposition layer of silver and silica colloidal solution, Group C (test): titanium discs with double deposition of silver colloidal solution relative to group B, and Group D (test): extra polished titanium discs deposited with a layer of silver colloidal solution. For cytotoxicity analysis, the materials were cultured with fibroblasts and analyzed by direct cytotoxicity assays (MTT) with incubation period of 24h, 48h and 72h to determine the proliferation rate and cell viability. For structural control, scanning electron microscopy (SEM) was performed after 24h of incubation. The samples were not presented as cytotoxic and further studies should be performed aiming at in vivo results for a possible application of the coating on prosthetic implant components.

Keywords: Periimplantitis. Fibroblasts. Nanostructured films. Silver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Esquema de deposição por dip-coating 36

Figura 4.2 - Migração de fibroblastros do fragmento de tecido gengival 37

Figura 4.3 - Fibroblastos em DMEM 39

Figura 4.4 - Fibroblastos em MTT 40

Figura 4.5 - Fibroblastos em fenol 40

Figura 4.6 - Exemplo de variação colorimétrica de acordo com a viabilidade celular após MTT 41

Figura 5.1 - Gráfico *boxplot* da viabilidade celular de acordo com os grupos no momento de avaliação T1 (MTT 24) 47

Figura 5.2 - Gráfico *boxplot* da viabilidade celular de acordo com os grupos no momento de avaliação T2 (MTT 48) 48

Figura 5.3 - Gráfico *boxplot* da viabilidade celular de acordo com os grupos no momento de avaliação T3 (MTT 72) 49

Figura 5.4 - MEV Disco A (300X) 50

Figura 5.5 - MEV Disco A (750X) 50

Figura 5.6 - MEV Disco A (2000X) 50

Figura 5.7 - MEV Disco A (300X) 50

Figura 5.8 - MEV Disco A (750X) 51

Figura 5.9 - MEV Disco A (2000X) 51

Figura 5.10-MEV Disco B (2000X) 51

Figura 5.11-MEV Disco C (750X) 52

Figura 5.12-MEV Disco C (2000X) 52

Figura 5.13-MEV Disco C (36X) 52

Figura 5.14-MEV Disco C (300X) 52

Figura 5.15-MEV Disco C (2000X) 53

Figura 5.16-MEV Disco C (2000X) 53

Figura 5.17-MEV Disco D (750X) 53

Figura 5.18-MEV Disco D (750X 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Prata
Ag + mHA	Micropartículas de HA
Ag + nHA	Nanopartículas de hidroxiapatita
Ag NPs	Nanopartículas de prata
ANOVA	Do inglês Analysis of Variance (Análise de Variância)
CAAE	Certificado de apresentação para Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CO_2	Dióxido de carbono
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio-padrão
ELISA	Do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HMDS	Hemetildisizilano
HA	Hidroxiapatita
IIQ	Intervalo interquartil
LELO	Laboratório Especial de Laser em Odontologia
M	Média
Me	Mediana
Mg	Magnésio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Teste de citotoxicidade pelo método direto
O_2	Oxigênio
PBS	Do inglês phosphatebuffered saline (tampão fosfato-salina)
ROS	Do inglês reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)
SDH	Enzima succinato-desidrogenase
SiO2	Dióxido de silício
TESPSA	Do inglês triethoxysilypropyl succinic anhydride

Ti Titânio

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
Cm	Centímetros
et al	Do Latim Et alia (e outros)
M	Molar
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
Nº	Número
Rpm	Rotação por minuto
Vs.	Versus
Mm	Milímetros
%	Porcentagem
®	Marca registrada
Nm	Nanômetros
mm^2	Milímetros cúbico
~	Aproximadamente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23
2 REVISÃO DE LITERATURA 25
3 PROPOSIÇÃO 33
4 MATERIAL E MÉTODOS 35
4.1 SÍNTESE DOS REVESTIMENTOS NANOESTRUTURADOS COM PRATA 35
4.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS 36
4.3 CULTURA DE FIBROBLASTOS 38
4.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE DIRETA 39
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 41
5 RESULTADOS 43
5.1 TESTE DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DIRETO (MTT) 43
5.2 RESULTADOS MTT 44
5.3 RESULTADOS MEV 49
6 DISCUSSÃO 55
7 CONCLUSÕES 57
REFERÊNCIAS 59
ANEXOS 69

1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários são amplamente utilizados para substituir dentes perdidos, e devem ter a indicação e acompanhamento corretos a fim de se manter a saúde dos tecidos peri-implantares. Entre as complicações peri-implantares pode-se citar a mucosite peri-implantar e a peri-implantite, correspondentes a uma inflamação que pode acometer os tecidos moles e duros em torno dos implantes, podendo implicar em maiores dificuldades para o tratamento (Lee et al., 2017).

Nos últimos anos muito se investiu em estudos e produção de biomateriais que aprimorassem a osseointegração. As alterações na macro e micro geometrias dos implantes propuseram um grande avanço nos conceitos e aplicações clínicas na implantodontia, embora estas modificações tenham sido implementadas para melhorar o sucesso clínico dos implantes dentários, a alta incidência de complicações nos implantes revestidos de superfície rugosa permitiu a hipótese de que esses implantes poderiam ser mais propensos à peri-implantite (Daubert et al., 2015; Zandim-Barcelos et al., 2019).

Considerando que os implantes são um sistema que ficam em contato não só com tecido ósseo, mas também com a mucosa deve-se haver uma preocupação em relação ao contato desse sistema com o meio bucal de maneira que se evite uma possível contaminação (Lindhe et al., 2008).

Os sinais clínicos dos implantes insatisfatórios são semelhantes aos encontrados nos dentes periodontalmente comprometidos. Entre eles se observam supuração, sangramento, dor, profundidade da bolsa aumentada, e a radiolucidez radiográfica, que indicam perda óssea ao redor do implante (Albrektsson e Isidor, 1994), assim como nas doenças periodontais a prevenção destas complicações é extremamente importante, já que existem poucas evidências de protocolos de tratamento eficazes para o tratamento da peri-implantite, uma doença crônica, progressiva (Mombelli; Lang, 1998) e uma das maiores causas para perda de implantes osseointegrados (Quirynen et al., 2002). Existem alguns relatos de resultados favoráveis em relação ao tratamento destas

doenças, apenas a curto prazo. Na maioria dos pacientes e implantes relataram a recorrência da doença e a progressão da perda óssea (Heitz-Mayfield et al. ,2018)

O biofilme é reconhecido atualmente como o principal fator etiológico responsável pelas doenças peri-implantares, já que assim como nos dentes estas redes microbianas conferem capacidades de resistência a antibióticos (Avila et al., 2017).

A prata (Ag) vem sendo usada na área da saúde como agente antimicrobiano, alternativo ao uso de medicamentos, há anos (Wang et al., 2015), e ultimamente na forma de nanopartículas ou revestimentos nanoestruturados, que poderiam provocar ação direta no controle do biofilme, próximo aos tecidos de proteção peri-implantares (Gordon et al., 2010), com os implantes e seus componentes protéticos.

Apesar dos possíveis benefícios da ação antimicrobiana da prata nestes revestimentos nanoestruturados, alguns estudos relatam certa preocupação sobre o seu efeito citotóxico (Ivask et al., 2014). Assim, visando a produção de componentes protéticos com revestimentos ou filmes com efeito antimicrobiano capazes de permitir uma ação preventiva para as doenças peri-implantares, buscamos determinar *in vitro* a citotoxicidade de um revestimento nanoestruturado com diferentes concentrações de prata frente a fibroblastos simulando o contato desse material com os tecidos de proteção peri-implantares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Por volta de 1950, os estudos em reposições ortopédicas tiveram grande impulso com a descoberta na Suécia, por Brånemark et al. (1977), do fenômeno da osseointegração e suas aplicações práticas, incentivando a pesquisa de biomateriais, principalmente a aplicação de materiais metálicos na Implantodontia.

Com o avanço nas pesquisas houve o aprimoramento dos sistemas de implantes em relação a osseointegração, por meio dos tratamentos de superfícies que conferem rugosidades macro e micro estruturais e, também, algumas propriedades químicas favoráveis que contribuem nos avanços na qualidade da osseointegração, mas que por outro lado podem levar ao aumento dos riscos de adesão do biofilme bacteriano peri-implanto patogênicos (Daubert et al., 2015). Heitz-Mayfield et al. (2018) relataram a partir de revisão sistemática que o tratamento superficial dos implantes pode interferir no risco de doenças peri-implantares.

Com a consolidação dos tratamentos de superfície dos implantes e maior entendimento sobre os mecanismos celulares de osseointegração, notou-se também a necessidade de estudos e desenvolvimento de novos tratamento de superfície para que se evitasse a contaminação do espaço entre tecido conjuntivo e o implante através de vedação e possível prevenção da formação de biofilme (Souza et al., 2019), porém é sabido sobre a dificuldade em se encontrar um equilíbrio entre ação antimicrobiana e a manutenção do tecido peri-implantar.

Recentemente, Karatas et al. (2019) estudaram a morfologia tecidual entre tecidos peri-implantares saudáveis e não saudáveis e apontaram maior nível de células fibroblásticas em tecidos livre de doenças peri-implantares, reforçando a escolha de tipo celular de nosso estudo.

Lee et al. (2017) confirmaram que as doenças peri-implantares afetam um número significativo de implantes dentários e pacientes. Desta forma, seria importante compreender as dificuldades no diagnóstico dessas doenças e os fatores de risco que podem ser modificados para reduzir o potencial de ocorrência ou progressão da doença.

Renvert et al. (2018) buscaram identificar definições e critérios clínicos para diagnóstico de tecidos saudáveis peri-implantares, mucosite peri-implantar e peri-implantite e definiu-se que na ausência de radiografias anteriores, o nível ósseo radiográfico ≥ 3 mm, em combinação com sangramento à sondagem e a profundidade de sondagem ≥ 6 mm são indicativos de peri-implantite.

Albrektsson e Isidor (1994), no primeiro Workshop em Periodontia, definiram peri-implantite como um processo inflamatório que afeta os tecidos ao redor do implante osseointegrado em função, resultando em perda de suporte ósseo. As bactérias presentes em um dente saudável são os cocos e os bastonetes gram-negativos facultativos, e em um implante com tecido peri-implantar não saudável ocorrem *Fusobacterium*, *Spirochaeta*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Campylobacter rectus*. Essas bactérias são relatadas por serem a causa da perda de osso peri-implantar em falhas de osseointegração. Sendo, portanto, as Bactérias Gram-negativas anaeróbias os principais patógenos encontrados nos sítios com doença peri-implantar (Heitz-Mayfield, 2008; Dawson; Jasper, 2015).

Outros fatores como higiene bucal inadequada, histórico prévio de doença periodontal, predisposição genética, tabagismo, doenças sistêmicas desreguladas, topografia da superfície do implante, e material residual após a cimentação protética também são relatados na literatura como possíveis fatores desencadeadores das doenças peri-implantares (Dawson; Jasper, 2015; Romanos, 2015).

French et al. (2019) notaram em uma revisão sistemática que os indicadores de risco com impacto significativo no nível ósseo incluíram: doença auto-imune, tabagismo intenso, terapia com bifosfonatos, localização do implante, diâmetro e design, além da presença de defeito ósseo no local do implante.

Albrektsson et al. (2014) sugeriram por outro lado que a reabsorção óssea marginal ao redor do implante seria como uma resposta ao corpo estranho e não está relacionada principalmente a processos infecciosos e sim a uma resposta desequilibrada do organismo.

Diversos autores como Zandim-Barcelos et al. (2019) associam também o tempo de instalação do implante como um fator de risco. Segundo eles as doenças peri-implantares podem ser cada vez mais frequentes devido ao aumento de pacientes com implantes com tempo de instalação e o que determinam ainda que o principal fator de risco associado seria a existência de doença periodontal prévia ao implante. A etiopatogenia da peri-implantite estaria relacionada principalmente a reservatórios de periododontopatógenos de bolsas residuais, embora fatores que facilitem a colonização da superfície do implante e a suscetibilidade à infecção também influenciem (Albrektsson et al., 2014).

Jepsen et al. (2015) avaliaram os riscos potenciais que contribuem para o desenvolvimento da mucosite peri-implantar e puderam concluir que a colocação do implante e as reconstruções protéticas precisam permitir a higienização adequada, diagnóstico por sondagem e remoção profissional da placa, o que não ocorre em muitos casos.

Mameno et al. (2019) num estudo longitudinal sobre indicadores de risco para peri-implantite notaram que a idade, o controle de placa, região dos implantes e o número de suportes oclusais foram significativamente correlacionados com o desenvolvimento da peri-implantite.

Apesar da dificuldade em se encontrar um protocolo de tratamento para doenças peri-implantares bem sucedido, existem algumas evidências de que essas poderiam ser tratadas com sucesso em pacientes aderentes a um programa de cuidados de suporte que envolve a remoção profissional de biofilme em implantes e dentes (Roccuzzo et al., 2018).

Em outro estudo com cães labradores notou-se que a reparação após o tratamento cirúrgico reconstrutivo da peri-implantite experimental foi superior em torno dos implantes com superfície lisa do que os implantes com superfície moderadamente rugosa e que os benefícios do uso de materiais de substituição óssea durante a terapia cirúrgica foram em geral pequenos (Almohandes et al., 2019).

De acordo com van Winkelhoff (2012), inúmeros modelos de ação têm sido propostos, com a função de interferir na adesão bacteriana, tais como a alteração da energia de superfície, ou modelos que utilizam moléculas de liberação controlada de antibióticos e de íons metálicos, os quais garantem atividade bactericida.

A prata vem sendo utilizada na Odontologia por conta da sua ação antimicrobiana há mais de 20 anos não só na Implantodontia. Íons de prata foram inseridos na composição de resinas compostas na tentativa de se prevenir a cárie secundária em restaurações, por exemplo (Yoshida et al., 1999).

Kheur et al. (2017) notaram que embora os implantes dentários de titânio sejam biocompatíveis, com excelente resistência à corrosão e alta resistência mecânica, o material falha por exibir baixa atividade antimicrobiana e, então, testaram a deposição de prata por corrente contínua sobre o material tanto no âmbito microbiológico quanto celular e obtiveram respostas biocompatíveis moderadas frente a células primárias de fibroblastos e o material mostrou excelentes efeitos antibacterianos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus mutans* em uma concentração muito baixa, ilustrando que o titânio depositado em prata poderia ser um material promissor.

Vilarrasa et al. (2018) ressaltaram que a peri-implantite é uma doença infecciosa com sua prevalência aumentando consideravelmente e por isso consideraram também o desenvolvimento de estratégias como superfícies de titânio revestidas com antibacterianos como uma opção promissora para prevenção. Testaram nanopartículas de prata e silanização (triethoxysilypropyl succinic anhydride) TESPSA e avaliaram a adesão de biofilme e a viabilidade celular bacteriana sobre discos de titânio com ou sem tratamento de superfície com diferentes níveis de rugosidade e revestimentos, sendo que o TESPSA se

apresentou capaz de atender aos seus objetivos, enquanto, a deposição de prata parecia não conferir essas propriedades antibacterianas.

Zheng et al. (2012) também pesquisaram o uso da prata na Implantodontia através de implantes com superfície nanoestruturada e aplicação de prata. A ação antimicrobiana foi testada em cepas de *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Candida albicans* e observaram ótimos resultados, com eliminação quase que completa dos micro-organismos e ainda sem efeito em osteoblastos.

Cal et al. (2017) estudaram os efeitos citotóxicos de sete materiais comerciais de implantes dentários usando métodos de cultura de células osteoblásticas e sugerem que materiais puros de implantes dentários com um número menor de elementos adicionais podem observar menos efeitos citotóxicos do que outros materiais de implantes que foram testados.

Segundo Zhang et al. (2014), com o aumento da exposição das nanopartículas de prata (AgNPs) a seres humanos, o risco de segurança atraiu atenção do público em geral e de pesquisadores para o assunto. Os autores destacaram os efeitos mediados pelos AgNPs na célula, como captação celular e distribuição intracelular, citotoxicidade, genotoxicidade e respostas imunológicas, além de alguns dos principais fatores que influenciam esses efeitos in vitro e in vivo, e alertou para a avaliação dos riscos do uso de AgNPs inadequadamente no futuro.

Salaie et al. (2020), relatam que apesar da ação antimicrobiana das nanopartículas de prata, com usos potenciais em implantes, podem ser tóxicas para as células de mamíferos. Desta forma, buscaram melhorar a biocompatibilidade de implantes dentários de titânio revestidos com AgNP acrescentando hidroxiapatita (HA) aplicada à superfície. No geral, os implantes revestidos com Ag + nHA mantiveram um maior grau de biocompatibilidade frente a osteoblastos em comparação aos revestidos com Ag + mHA, ou AgNPs isolados, sugerindo que o primeiro tem um benefício para o uso clínico.

Ainda buscando melhorias nos tratamentos de superfície tanto no aspecto da osseointegração como na questão da prevenção da colonização bacteriana, Sobolev et al. (2019) estudaram a biocompatibilidade e a bioatividade de alguns tipos de revestimentos: superfície de Ti com deposição de HA, um revestimento de

óxido de titânio contendo cálcio e fósforo e nanopartículas de Ag. Os autores observaram eficácia antibacteriana (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) mais significativa nos revestimentos contendo nanopartículas de Ag em comparação com um revestimento que não contém prata.

Nascimento et al. (2019) avaliaram a eficácia de uma pasta de iodofórmio e pilares revestidos de prata na prevenção da colonização e vazamento microbianos através da interface implante-pilar de implantes de cone morse e hexágono interno. As análises indicaram uma interação significativa entre conexões, tratamentos antimicrobianos e espécies bacterianas avaliadas. A frequência de contaminação foi reduzida nos implantes submetidos aos tratamentos antimicrobianos e os pilares com iodofórmio e revestidos com prata reduziram bastante a contagem microbiana total nos implantes hexagonais internos, mas a menor contagem microbiana apontada ocorreu nos implantes de cone morse com pilares revestidos de prata.

Bressan et al. (2019) buscaram identificar o papel das nanopartículas de titânio liberadas dos implantes na inflamação crônica e na lise óssea no tecido peri-implantar, analisando o efeito da exposição de partículas de titânio (Ti) em células-tronco mesenquimais e fibroblastos. Os resultados sugerem que as partículas de Ti podem induzir a produção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), recrutando neutrófilos capazes de produzir alto nível de metaloproteinase, o que por sua vez induz a degradação das fibras de colágeno. E por fim, esses eventos podem influenciar o comprometimento das células-tronco, o que gera um desequilíbrio na regeneração óssea.

Zhu et al. (2020) estudaram outros metais e demonstraram que o titânio modificado por Mg revelou melhorias nas capacidades de adesão, proliferação, migração e remodelação da matriz extracelular de fibroblastos gengivais humanos.

Smanio (2017) avaliou a ação antibacteriana desses mesmos três tipos diferentes de revestimentos nanoestruturados com prata aplicados à Ti frente a cepas de microrganismos peri-implanto-patogênicos. Após a determinação do melhor revestimento, foi avaliado se a quantidade de prata (3 ou 6 camadas) interfere na formação de biofilmes monoespécie de *S. gordonii* sendo que o melhor resultado foi encontrado com revestimento SiO2 (6 camadas), obtendo

resultados antimicrobianos semelhantes a clorexidina 0,12%, justificando a escolha do revestimento utilizada no presente estudo.

Diante destes resultados (Smanio, 2017), Kassab (2015) avaliou a citotoxicidade celular destes revestimentos antimicrobianos, a proliferação, redução de viabilidade celular, adesão e morfologia celular de três revestimentos nanoestruturados associados a prata frente a osteoblastos e os resultados apresentaram biocompatibilidade em todos os revestimentos. E por conta disso, nesse estudo optou-se pela realização desses ensaios frente a fibroblastos, célula mais predominante no tecido gengival da região periimplantar.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar os efeitos citotóxicos em fibroblastos de mucosa oral humana de três tipos de revestimentos nanoestruturados associados a prata aplicados à superfície de discos de titânio através de testes de citotoxicidade direta (MTT) e análise estrutural em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram confeccionados discos de titânio de 5,9 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura, com a mesma barra de titânio utilizada para confecção de componentes protéticos utilizados e fornecidos pela empresa S.I.N Implante®. Esses discos passaram por um processo de anodização assim como os produtos da empresa e parte dos discos (grupos B, C e D) passou pela aplicação de revestimento nanoestruturado de prata e sílica (SiO2) desenvolvido pela empresa NANOX® Tecnologia (São Carlos – SP, Brasil).

Os discos foram polidos industrialmente com rodas de granulação decrescente realizados em três etapas: roda de feltro com esmeril 220 usando massa marrom para polimento (nicrotex), roda dura ventilada e roda amarela para brilho usando massa pratalux.

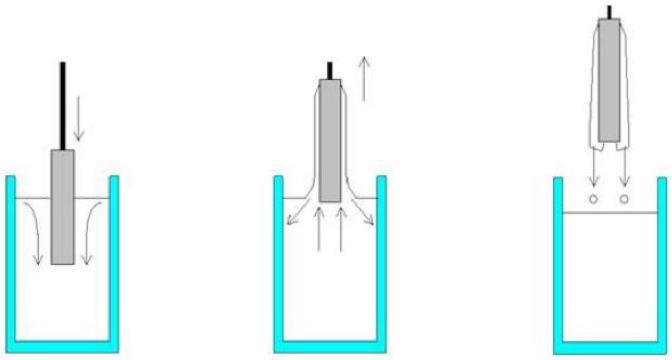
Após a aplicação e polimento os discos passaram por esterilização.

4.1 SÍNTESE DOS REVESTIMENTOS NANOESTRUTURADOS COM PRATA

Os revestimentos foram produzidos pela empresa Nanox Tecnologia S.A®. A síntese de uma suspensão coloidal de sílica com prata foi realizada em um solvente aquoso a partir do método sol-gel.

Para obter os revestimentos dos discos foi utilizado o método de dip-coating, como ilustrado na figura 4.1. Depois da deposição da suspensão coloidal, os discos foram tratados em um forno por uma hora em uma temperatura de 120 °C para evaporar a água e permitir a formação do agente antimicrobiano nas ilhas. As partículas de prata apresentam tamanho médio de partícula de 200 nm.

Figura 4.1 - Esquema de deposição por dip-coating



Fonte: Smanio (2017).

Os discos de titânio foram divididos em 4 grupos:

Grupo A (Controle): Discos de titânio sem deposição (branco)

Grupo B (Teste): Discos de titânio com uma camada de deposição da solução coloidal de prata e sílica

Grupo C (Teste): Discos de titânio com duas camadas (dobro de concentração) de deposição de solução coloidal de prata e sílica

Grupo D (Teste): Discos de titânio extra polidos com uma camada de deposição de solução coloidal de prata e sílica

4.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS

Foi realizada uma cultura primária de fibroblastos humanos a partir de fragmento de mucosa queratinizada coletados na Clínica da FOUSP sob Direção da Clínica Integrada da FOUSP, segundo aprovação do Comitê de Ética segundo parecer CAAE: 92321918.1.0000.0075 (Anexo A) e a doação dos fragmentos pelos pacientes foi feita mediante assinatura de formulário específico (Anexo B).

Os fragmentos foram coletados durante o procedimento de reabertura de implantes, adequadamente manipulados a fim de se evitar contaminação e colocados em meio de cultura para fibroblastos, meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) e 1% de solução antimicrobiana-antimicótica (Sigma®).

Esses fragmentos foram levados ao Setor de Cultura Celular do Laboratório de Biologia Oral da FOUSP, lavados três vezes com solução tampão *phosphate buffered saline* (PBS) estéril e plaqueados em placas de poliestireno com DMEM. Foi aguardado que a células do fragmento migrassem para a placa, o que ocorreu após aproximadamente 7 dias (Figura 4.2). Após a migração, os fragmentos foram retirados das placas e em 3 semanas as placas começaram a apresentar entre 80% e 90% de confluência.

Figura 4.2 - Migração de fibroblastros do fragmento de tecido gengival

Fonte: O autor.

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para a cultura celular. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 95% de oxigênio (O_2) e 5% de dióxido de carbono (CO_2). O meio de cultura foi trocado periodicamente, a cada 2 ou 3 dias, e o acompanhamento da progressão da cultura foi feito com o microscópio invertido ZeissAxiovert 40 CFL para verificar migração e crescimento das células.

4.3 CULTURA DE FIBROBLASTOS

Quando as placas se apresentaram confluentes, as células foram suspensas com 5ml de tripsina 0,25% e foi adicionado 5ml de meio DMEM. Após esse processo o conteúdo das placas foi transferido para tubos cônicos de 50ml e a solução passou com centrifugação por 1 minuto em 1500rpm para a formação de um pellet no fundo do tubo. Então o meio com tripsina foi adequadamente aspirado para manutenção do pellet e substituído por 10ml de meio de cultura DMEM para ressuspensão das células.

Os fibroblastos viáveis foram corados por azul de metileno e contados em um hemicitômetro de Neubauer (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) em microscópio invertido ZeissAxiovert 40 CFL.

Após a contagem as células foram plaqueadas na densidade de ~ 100 células/mm^2 em placa de poliestireno de 96 poços (Corning ®, New York, Estados Unidos) em cada poço onde já havíamos colocado os discos e foi adicionado mais 100µl de meio de cultura DMEM em cada poço. Então as placas foram armazenadas em estufa a 37 °C.

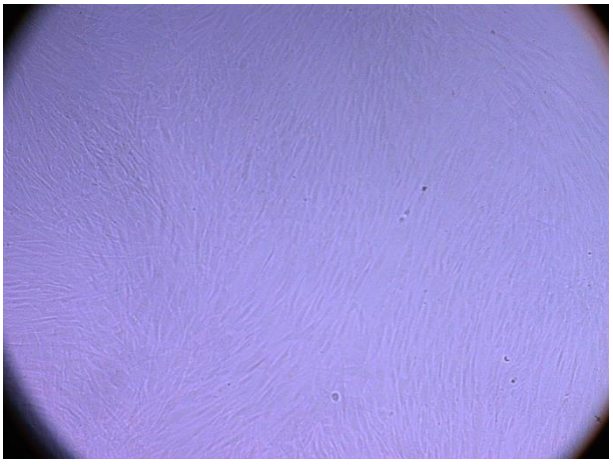
4.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE DIRETA

Para avaliação da viabilidade celular foi realizado o ensaio de MTT. Para controle tivemos os poços em que foram adicionadas apenas as células sem discos (controle vida / controle positivo), tivemos também os poços em que adicionados as células com fenol a 1% (controle de morte / controle negativo) e, por último, tivemos os poços em que foi adicionado apenas DMSO (dimetilsulfóxido) (controle branco). Todos controles foram dispostos em triplicata, e mantidas em condições favoráveis para seu desenvolvimento (Figura 4.3).

As células foram colocadas nos poços, sobre as amostras e controles. As análises executadas foram feitas após incubação nos períodos de 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. Transcorridos os tempos experimentais, as placas foram preparadas para o teste de citotoxicidade.

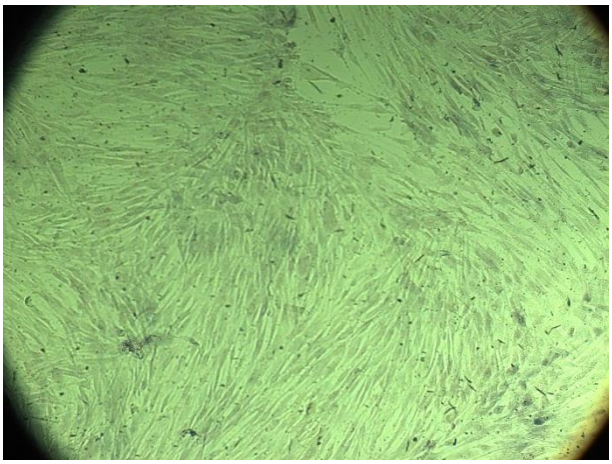
O meio de cultura foi retirado de todos os poços com os discos e dos controles de vida e de morte. Os poços foram lavados com 100uL de solução tampão *phosphate buffered saline* (PBS) estéril e após a remoção do PBS foram adicionados 100uL de MTT em cada poço das amostras e do controle de vida (Figura 4.4), enquanto nos poços de controle de morte foram adicionados 100uL de fenol a 1% (Figura 4.5). Após preparadas as placas foram incubadas em estufa a 37 ºC por 3 horas.

Figura 4.3 - Fibroblastos em DMEM



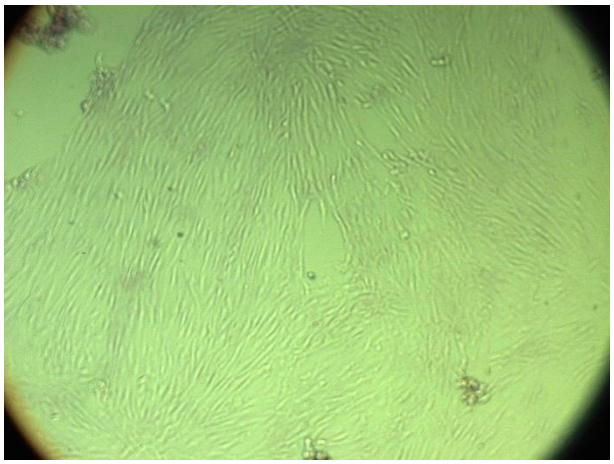
Fonte: O autor.

Figura 4.4 - Fibroblastos em MTT



Fonte: O autor.

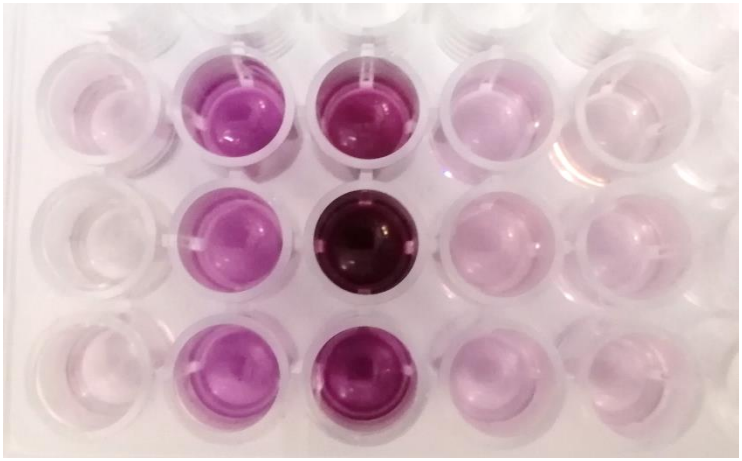
Figura 4.5 - Fibroblastos em fenol



Fonte: O autor.

Transcorrido esse período, a solução foi retirada, e em seguida, foram adicionados 100uL de DMSO em todos os poços em temperatura ambiente, mantendo-os por 5 minutos sob agitação, para solubilizar os cristais de coloração azul/violeta, formados pela clivagem dos anéis de tetrazolium pela enzima succinato-desidrogenase (SDH) das mitocôndrias ativas, tornando a coloração de cada poço com diferentes tons de violeta de acordo com a sua resposta à citotoxicidade (Figura 4.6). Após a solubilização, as soluções foram transferidas para os novos de poços, para que não houvesse interferência das amostras nos resultados, e foi efetuada a leitura em espectrofotômetro no aparelho de ELISA (ELX 800 – Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, ICC, USA) com comprimento de onda ajustado para 540 nm. Os resultados expressaram a porcentagem média de células viáveis. Após a obtenção desses valores foi possível a comparação entre as amostras e os controles.

Figura 4.6 - Exemplo de variação colorimétrica de acordo com a viabilidade celular após MTT



Fonte: O autor.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A observação em MEV foi realizada para avaliar a morfologia das células e a adesão às superfícies dos discos.

As amostras para MEV foram preparadas com o plaqueamento de fibroblastos em ~100 células/mm^2 sobre três discos de cada grupo (A, B, C e D) em cada poço de uma placa de poliestireno de 24 poços (Corning ®) e após 24 horas de armazenamento em estufa, efetuamos o preparo para análise em MEV.

O meio de cultura das células foi retirado, os poços lavados com PBS e seguido pela fixação das amostras, com solução de 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M – pH7,4, por 30 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido esse período, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,05M e desidratadas em crescentes diluições de etanóis. Logo após adicionamos hemetildisizilano (HMDS) por 10 minutos, e as amostras foram colocadas em capela com sistema exaustor para promover a secagem das amostras. As amostras foram montadas em suportes de alumínio (stubs) e

mantidas em estufa a 37º até a serem metalizadas no aparelho Baltec SCD 050 (OerlikonBalzers, Liechtienstein) por 70s, com uma camada de aproximadamente 25nm de ouro. Após preparadas as amostras foram avaliadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 430, operado com 15kV, no Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO).

5 RESULTADOS

A leitura dos ensaios de MTT foi realizada nos intervalos de 24h, 48h e 72h e de MEV somente 24h.

5.1 TESTE DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DIRETO (MTT)

A análise dos dados foi realizada usando o *software* IBM SPSS Statistics (SPSS for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Inicialmente, realizou-se a estatística descritiva objetivando caracterizar a amostra, que correspondeu ao cálculo de medidas de tendência central e de variabilidade para as variáveis quantitativas. O pressuposto de normalidade dos dados foi investigado por meio do teste de Shapiro-Wilk, porém não foi confirmado. Portanto, testes estatísticos não paramétricos foram usados para determinar a significância das diferenças intergrupos e intragrupos (Hannigan; Lynch, 2013; Larson; Farber, 2016).

Nas análises os grupos foram nomeados da seguinte forma: Grupo A (branco) = G1; Grupo B (uma camada) = G2; Grupo C (duas camadas) = G3; Grupo D (extra polido) = G4; Controle de vida = G5; Controle de morte = G6; Controle branco = G7 e os tempos de avaliação como: 24h = T1; 48h = T2; 72h = T3. O teste de Kruskal-Wallis foi empregado para identificar diferenças significativas intergrupos (G1 vs G2 vs G3 vs G4 vs G5 vs G6 vs G7) em relação à viabilidade celular considerando os dados obtidos (Tabela 5.1). Por fim, o teste ANOVA de Friedman para medidas repetidas foi usado para determinar diferenças significativas intragrupos de acordo com os tempos de avaliação (T1 vs T2 vs T3) (Figuras 5.1 a 5.3). As comparações múltiplas de médias foram realizadas com ajuste de Bonferroni. Em todas as análises, fixou-se o nível de significância em 5% ($p < 0,05$) e considerou-se um intervalo de confiança de 95%.

5.2 RESULTADOS MTT

Na avaliação intergrupo, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,001$). Após realizar as comparações múltiplas, considerando os dados de T1 e T2 observou-se que: G3 > G2 > G4 > G5 > G1 > G6=G7. Ao final do ensaio, considerando os dados de T3, as diferenças entre G3 e G2 deixaram de ser estatisticamente significativas nessa avaliação intergrupo, sendo identificado que: G3=G2 > G4 > G5 > G1 > G6=G7.

Os valores medianos para o G3 foram 0,527 (IIQ = 0,351-0,835) em T1; 0,658 (IIQ = 0,457-0,827) em T2; e 0,520 (IIQ = 0,328-0,912) em T3. Os valores medianos para o G2 foram 0,326 (IIQ = 0,176-0,699) em T1; 0,377 (IIQ = 0,251-0,758) em T2; e 0,532 (IIQ = 0,247-0,880) em T3.

Já na avaliação intragrupo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre T1, T2 e T3 para os grupos G2 ($p = 0,656$), G3 ($p = 0,869$), G4 ($p = 0,581$), G6 ($p = 0,204$), G7 ($p = 0,599$). As exceções foram o G1 ($p < 0,001$) e o G5 ($p < 0,001$), em que os valores foram maiores em T2 em comparação com T1 e T3.

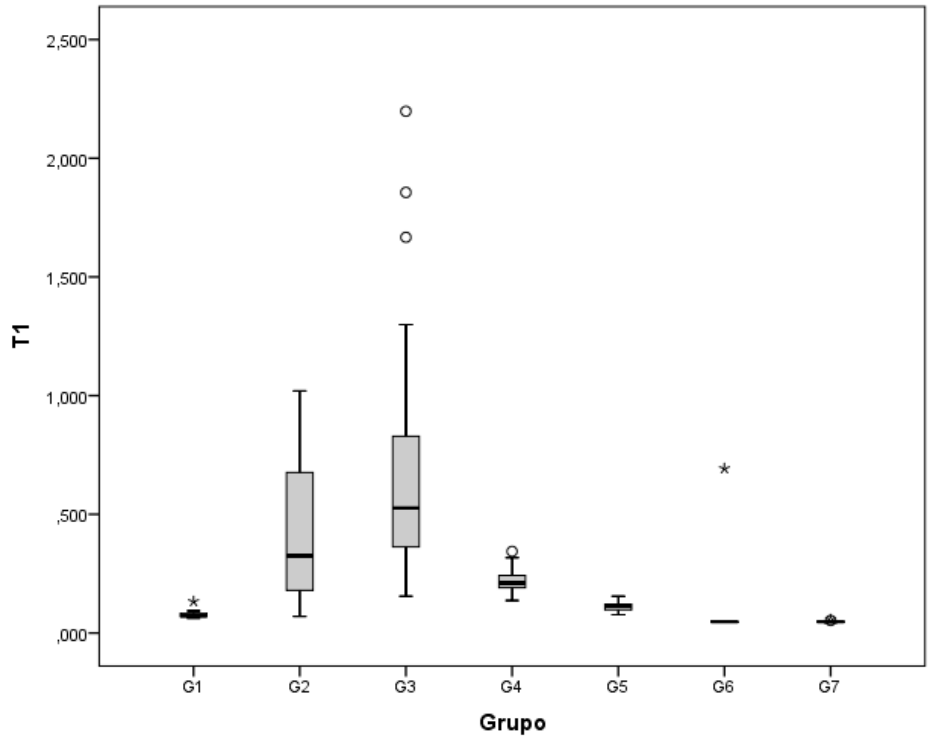
Tabela 5.1 - Análise comparativa da viabilidade celular de acordo com os grupos e diferentes tempos de avaliação

Grupo	Tempos de avaliação															
	T1					T2					T3					p-valor(2)
	M	DP	Me	IIQ		M	DP	Me	IIQ		M	DP	Me	IIQ		
				P25	P75				P25	P75				P25	P75	
G1	0,076^{Eb}	0,013	0,073	0,069	0,083	0,098^{Ea}	0,018	0,096	0,087	0,110	0,084^{Db}	0,013	0,085	0,073	0,090	**< 0,001***
G2	0,431^{Ba}	0,302	0,326	0,176	0,699	0,479^{Ba}	0,303	0,377	0,251	0,758	0,610^{Aa}	0,418	0,532	0,247	0,880	0,656
G3	0,684^{Aa}	0,493	0,527	0,351	0,835	0,699^{Aa}	0,375	0,658	0,457	0,827	0,638^{Aa}	0,374	0,520	0,328	0,912	0,869
G4	0,221^{Ca}	0,058	0,211	0,188	0,248	0,223^{Ca}	0,047	0,209	0,193	0,239	0,206^{Ba}	0,119	0,189	0,125	0,256	0,581
G5	0,112^{Db}	0,017	0,112	0,098	0,123	0,138^{Da}	0,024	0,144	0,119	0,161	0,099^{Cb}	0,022	0,094	0,083	0,113	**< 0,001***
G6	0,070^{Fa}	0,118	0,048	0,047	0,049	0,049^{Fa}	0,001	0,048	0,048	0,049	0,048^{Ea}	0,002	0,048	0,047	0,048	0,204
G7	0,048^{Fa}	0,002	0,048	0,047	0,049	0,048^{Fa}	0,002	0,048	0,047	0,049	0,048^{Ea}	0,001	0,048	0,047	0,049	0,599
p-valor(1)	**< 0,001***					**< 0,001***					**< 0,001***					

Nota: Grupos (G1 = Branco; G2 = SiO_2; G3 = Plus; G4 = Extra polido; G5 = Controle de vida; G6 = Controle de morte; G7 = Controle branco); Tempos de avaliação (T1 = MTT 24; T2 = MTT 48; T3 = MTT 72); M = média; DP = desvio-padrão; Me = mediana; IIQ = intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75); Letras diferentes denotam resultados significativamente diferentes (p<0,05); (1) Letras maiúsculas comparam valores na vertical (avaliação intergrupo); (2) Letras minúsculas comparam valores na horizontal (avaliação intragrupo); * Diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% (p < 0,05).

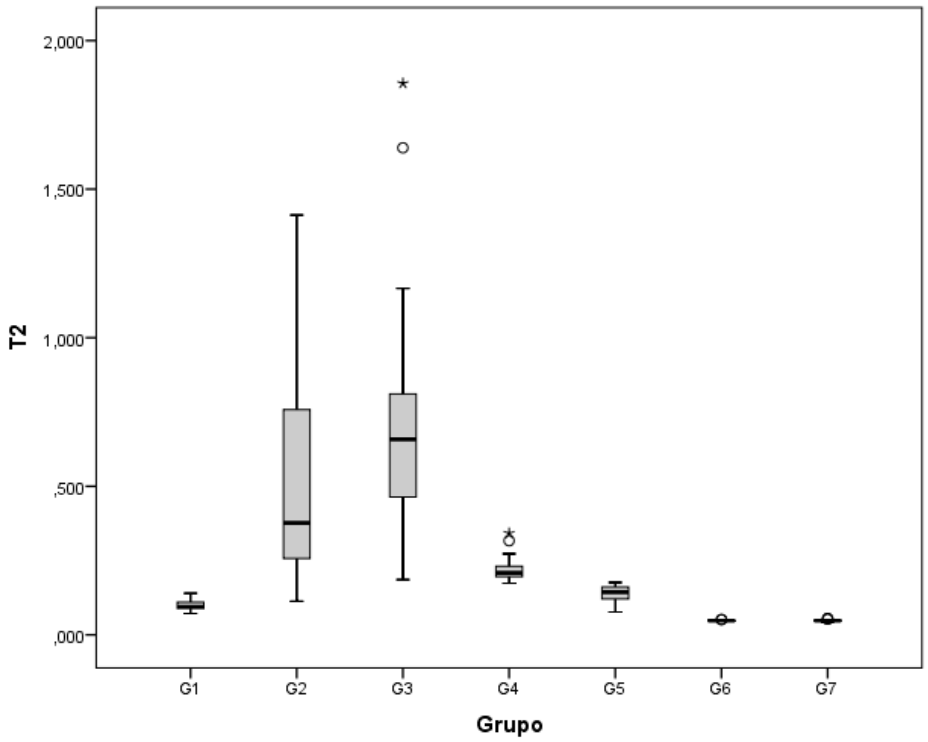
Fonte: O autor.

Figura 5.1 - Gráfico *boxplot* da viabilidade celular de acordo com os grupos no momento de avaliação T1 (MTT 24)



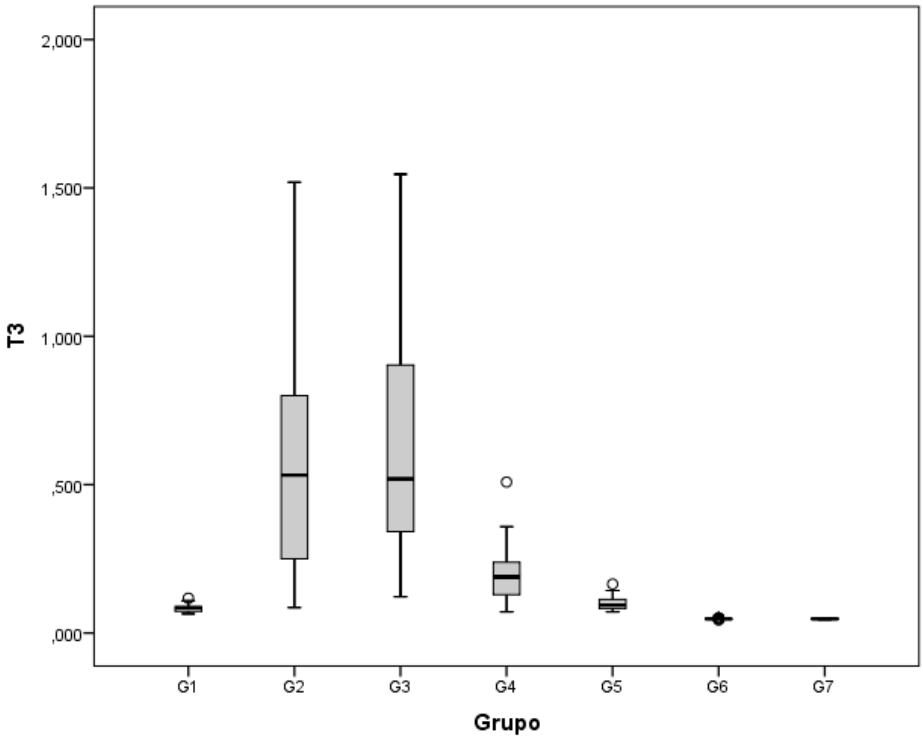
Fonte: O autor.

Figura 5.2 - Gráfico *boxplot* da viabilidade celular de acordo com os grupos no momento de avaliação T2 (MTT 48)



Fonte: O autor.

Figura 5.3 - Gráfico *boxplot* da viabilidade celular de acordo com os grupos no momento de avaliação T3 (MTT 72)

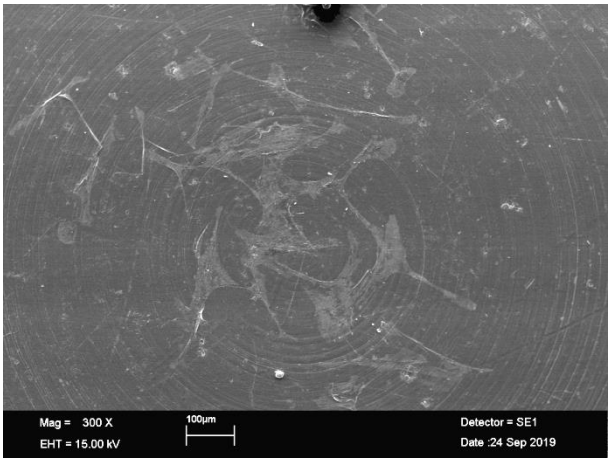


Fonte: O autor.

5.3 RESULTADOS MEV

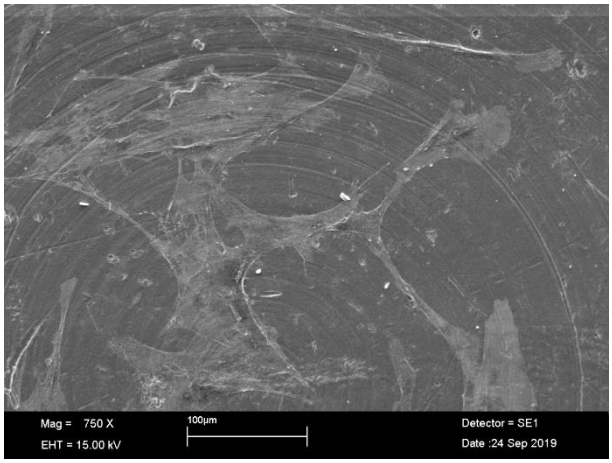
Nas imagens geradas em MEV dos discos A em contato com os fibroblastos, pudemos observar a presença de irregularidades e sujidades na superfície dos discos, o que também foi observado nos discos B e C. Foram encontradas células em todos os discos analisados, algumas achatadas sobre a superfície (Figuras 5.4 a 5.9).

Figura 5.4 - MEV Disco A (300X)



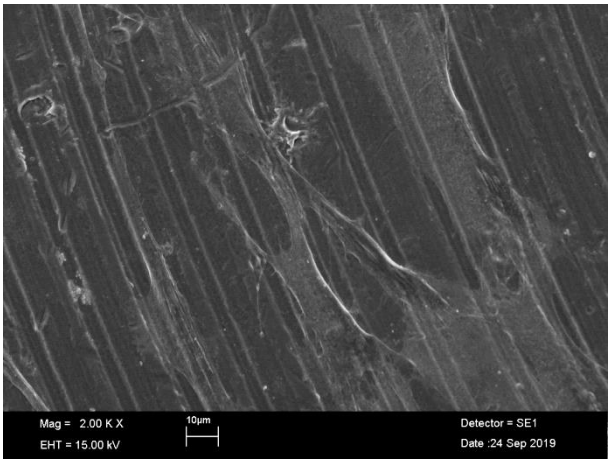
Fonte: O autor.

Figura 5.5 - MEV Disco A (750X)



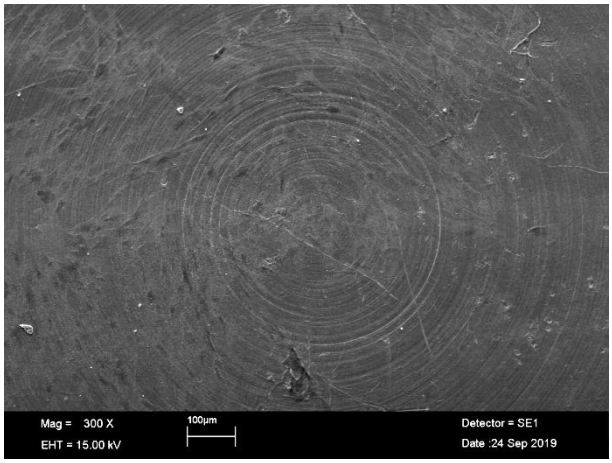
Fonte: O autor.

Figura 5.6 - MEV Disco A (2000X)



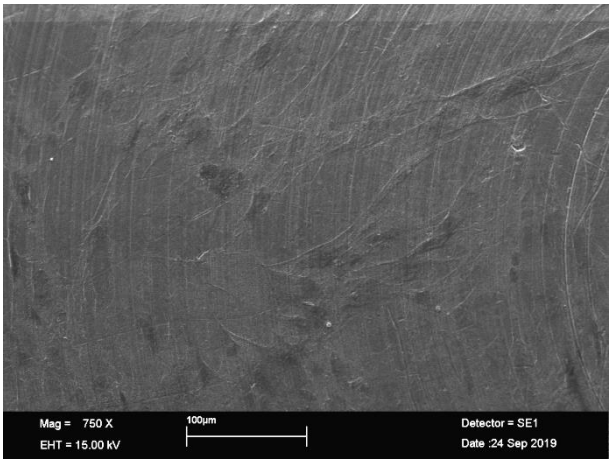
Fonte: O autor.

Figura 5.7 - MEV Disco A (300X)



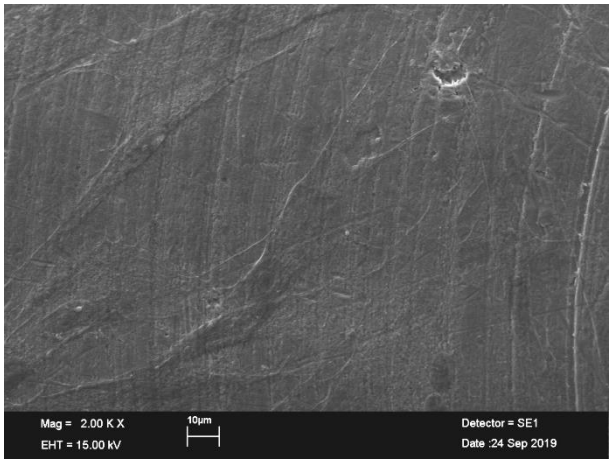
Fonte: O autor.

Figura 5.8 - MEV Disco A (750X)



Fonte: O autor.

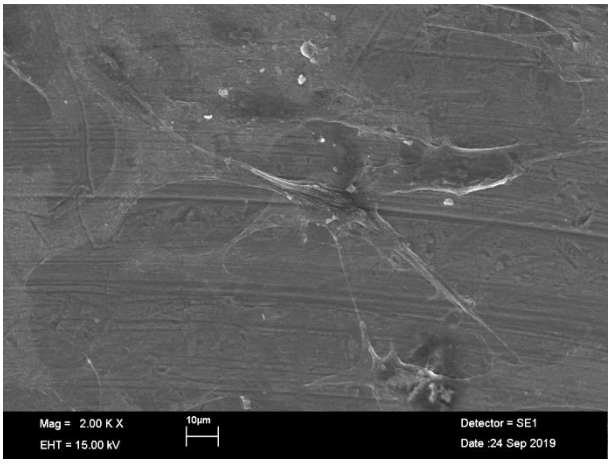
Figura 5.9 - MEV Disco A (2000X)



Fonte: O autor.

Dos discos B analisados em apenas um deles foram encontradas células e foram observadas imagens que sugerem uma cobertura não homogênea (Figura 5.10).

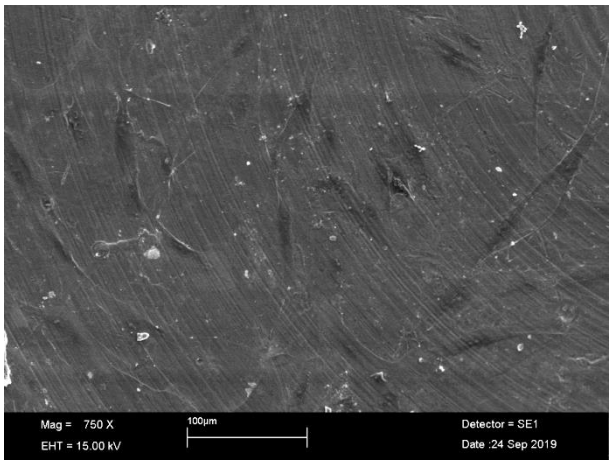
Figura 5.10 - MEV Disco B (2000X)



Fonte: O autor.

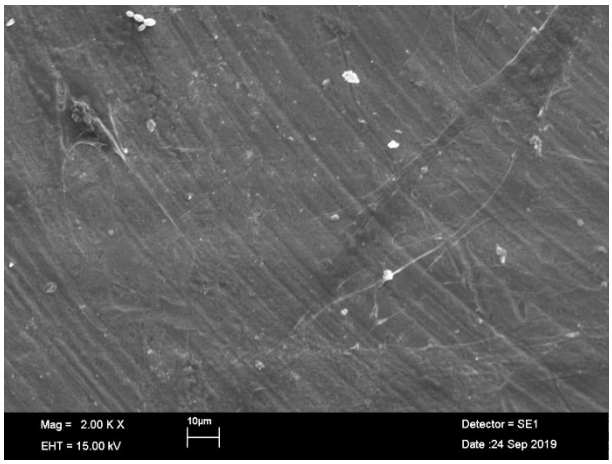
Nos discos C analisados foram encontradas células em todos os discos, sem alterações morfológicas aparentes e foi possível observar claramente as irregularidades sobre os discos (Figuras 5.11 a 5.16).

Figura 5.11 **-** MEV Disco C (750X)



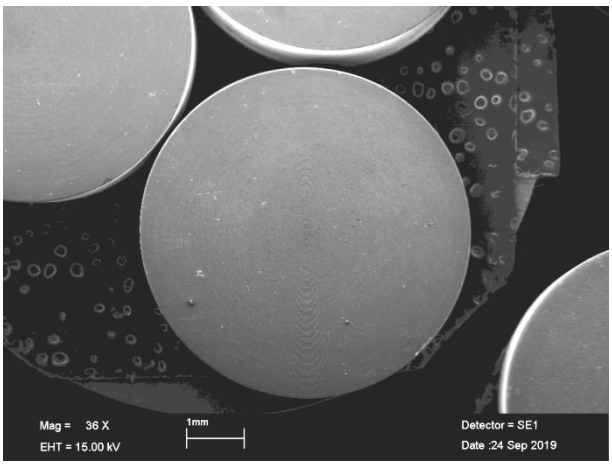
Fonte: O autor.

Figura 5.12 - MEV Disco C (2000X)



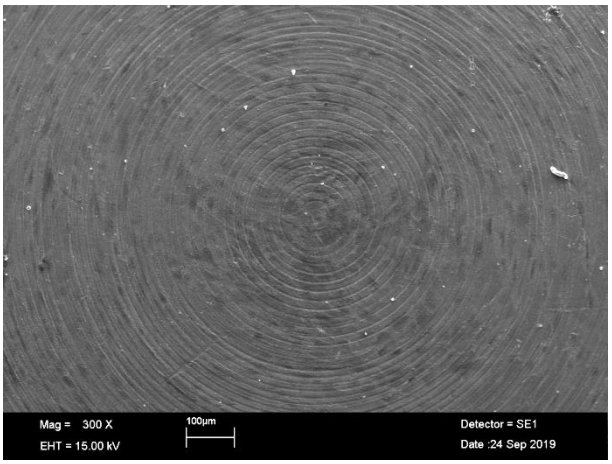
Fonte: O autor.

Figura 5.13 - MEV Disco C (36X)



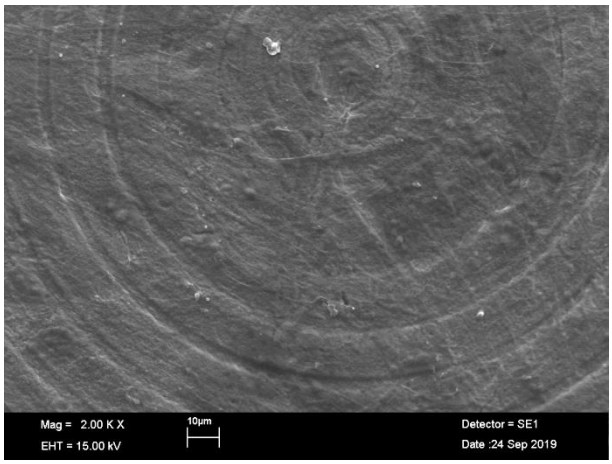
Fonte: O autor.

Figura 5.14 - MEV Disco C (300X)



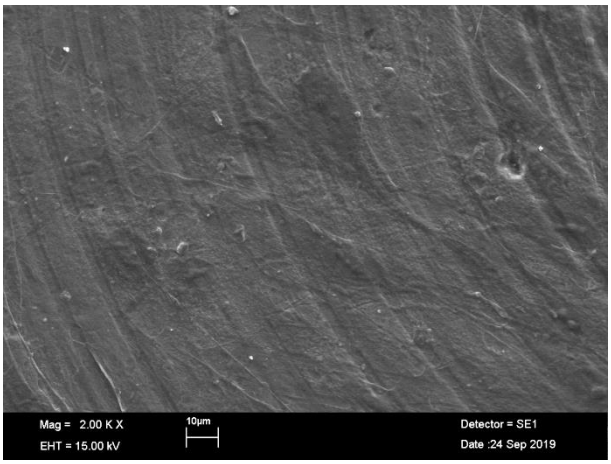
Fonte: O autor.

Figura 5.15 - MEV Disco C (2000X)



Fonte: O autor.

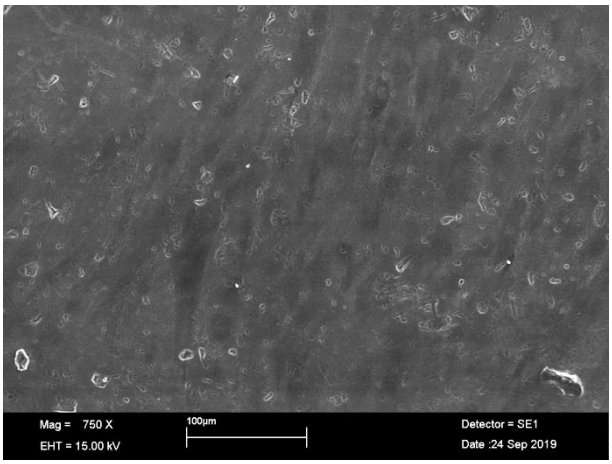
Figura 5.16 - MEV Disco C (2000X)



Fonte: O autor.

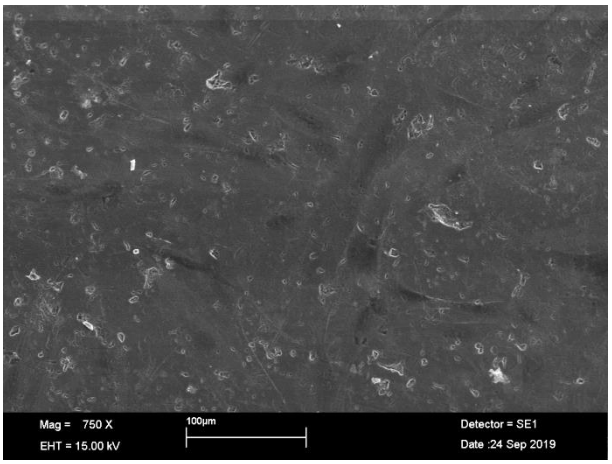
Já nos discos D foram observadas ausências das irregularidades na superfície dos discos provenientes da falta de polimento, mas ainda se observou falhas no revestimento, não havendo cobertura completa. Fibroblastos estavam presentes e sem alterações morfológicas novamente (Figuras 5.17 e 5.18).

Figura 5.17 - MEV Disco D (750X)



Fonte: O autor.

Figura 5.18 - MEV Disco D (750X



Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

A dificuldade de estabelecimento de um protocolo de tratamento preciso e eficaz para as doenças peri-implantares que vêm sendo cada vez mais prevalentes, nos leva a preocupação em relação a tentativa de encontrar soluções preventivas para estas patologias.

Por outro lado, a evolução tecnológica no desenvolvimento de biomateriais, nos permite estudar propriedades bioativas terapêuticas com finalidade de amplificar o desempenho destes. Certas propriedades antimicrobianas de alguns biomateriais poderiam ser incorporadas ao Sistema de Implantes dentários para interferir na manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares a médio e longo prazo.

Desta forma, encontrar um equilíbrio entre a ação antimicrobiana e o desempenho destes agentes nas células do nosso organismo pressupõe um grande campo de estudo. Assim, nossa proposta terapêutica estabelece o desafio de associar uma ação antimicrobiana ao titânio de componentes de próteses sobre implantes, com foco na diminuição da colonização de bactérias presentes no biofilme oral, assim como as bactérias associadas às doenças peri-implantares, com cunho preventivo. Neste aspecto, procuramos compreender como se estabeleceria a relação deste material bioativo nas células mais importantes presentes no selamento biológico, os fibroblastos da lâmina própria da mucosa oral.

A prata tem se apresentado como um material promissor como agente antimicrobiano e seu uso associado ao Ti poderia resultar em benefícios de maneira acessível para paciente e profissional (Zheng et al., 2012; Godoy-Gallardo et al., 2015; Cal et al., 2017; Kheur et al., 2017; Smanio, 2017; Vilarrasa et al., 2018; Nascimento et al., 2019; Salaie et al., 2020; Sobolev et al., 2019).

Os revestimentos nanoestruturados utilizados neste estudo poderiam proporcionar maior segurança e menor toxicidade evitando também problemas e

irritações locais, uma vez que a prata permanece, de uma certa forma, aprisionada na malha do material tratado, não sendo liberada para o meio e proporcionando não só segurança como também poderiam manter a eficiência por mais tempo.

Em nossos resultados dos ensaios de MTT as células foram analisadas dentro de cada grupo e apresentaram similaridade de comportamento em relação aos tempos experimentais, não havendo diferença significativa entre a maioria dos grupos nos intervalos de 24h, 48h e 72h, exceto nos grupos do disco A e controle de vida, onde houve maior proliferação celular no intervalo de 48h. Já na comparação intergrupos pudemos observar maior média de absorbância na leitura no disco C (duas camadas), inclusive maior do que os grupos controle, principalmente nos intervalos de 24h e 48h, comprovando a viabilidade celular do revestimento frente a fibroblastos, mesmo com maior concentração de prata aplicada.

A partir das 72h a maior proliferação deixou de existir apenas no grupo C que passou a apresentar os mesmos valores que o grupo B, seguidos, em ordem decrescente, pelos grupos D, controle de vida, disco A e controle de morte e controle branco. Sendo que os dois últimos apresentaram resultados similares em todos os intervalos e análises, comprovando a legitimidade da técnica.

Em relação a diferença de polimento apresentada pelo disco D foi necessária a complementação da análise das imagens da MEV para melhor compreensão. O polimento não apresentou grande diferença quanto a proliferação celular já que o comportamento foi semelhante aos outros grupos, sendo que sua média de absorbância na avaliação intergrupos foi menor que os grupos B e C, mas novamente maior do que os grupos controle.

O intervalo de 24h para análise dos fibroblastos sobre os discos em MEV possibilitou o tempo adequado para que as células se adaptassem e não houvesse alterações na morfologia e adesão após a sua suspensão. Apesar de não terem sido encontradas células em todas as amostras avaliadas, já que no disco B houve uma presença desigual de células, sendo que apenas uma das três amostras apresentou adesão celular, todos os grupos analisados apresentaram

células aderidas. E em relação a morfologia as células analisadas não apresentaram alterações.

Foi possível observar na MEV também a presença de irregularidades na aplicação do revestimento nanoestruturado sobre os discos de titânio, sugestivas de falha técnica que geraria ausência de padrão durante a aplicação do filme ou ainda sugestiva de que o polimento que não apresentou um padrão uniforme nos discos possa interferir na adesão do revestimento, já que o mesmo se apresentou com menores falhas no disco D que apresenta um polimento maior e mais uniforme.

Como destacado pelos estudos de Zhang et al. (2014), Cal et al. (2017) Salaie et al. (2020), Bressan et al (2019) existem riscos de citotoxicidade com a aplicação da prata livre, como princípio ativo. Entretanto, nossos resultados mostram que nas concentrações utilizadas e com a fixação da prata na malha do revestimento nanoestruturado, pudemos observar resultados semelhantes a Kassab (2015) e embora com metodologias diferentes, semelhantes a Kheur et al. (2017), Zheng et al. (2012), Sobolev et al. (2019), que observaram a prata como um agente antimicrobiano interessante para uso na implantodontia, sem interferência celular em estudos *in vitro*.

Porém é sabido que a análise de um único tipo celular em cultura celular deixa de contemplar características específicas a se considerar para o detalhamento dos resultados como as interações celulares, a presença de reações fisiológicas e imunológicas e ainda a presença de diversos fatores externos que influenciam na condição estudada.

Desta forma, poderíamos sugerir uma continuidade com estudos clínicos, ressaltando a importância de estudos visando a prevenção das doenças que acometem as reabilitações com implantes dentários.

7 CONCLUSÕES

Com as limitações deste estudo pudemos concluir:

- Os revestimentos não promoveram alterações morfológicas importantes nos fibroblastos.
- Os revestimentos não promoveram sinais de citotoxicidade frente aos fibroblastos quando comparados aos controles.

REFERÊNCIAS[1]

Albrektsson T, Dahin C, Jem T, Sennerbt L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal boné loss around oral implants the result of a provoked forein body reaction? Clin Implant Dent Relat Res. 2014 Apr;16(2):155-65. doi: 10.1111/cid.12142.

Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV. In: Lang NP, Karring T, editors. Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology. London: Quintessence; 1994. p. 365-9.

Almohandes A, Carcuac O, Abrahamsson I, Lund H, Berglundh T. Re-osseointegration following reconstructive surgical therapy of experimental peri-implantitis. A pre-clinical in vivo study. Clin Oral Implants Res. 2019 May;30(5):447-56. doi: 10.1111/clr.13430.

Avila ED, Vergani CE, Mollo Junior FA, Junior MJ, Shi W, Lux R. Effect of titanium and zirconia dental implant abutments on a cultivable polymicrobial saliva community. J Prosthet Dent. 2017 Oct;118(4):481-7. doi: 10.1016/j.prosdent.2017.01.010.

Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. Scand J Plast Reconstr Surg. 1977;Suppl:1-132.

Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Bellin G, Sbricoli L, Sivolella S, et al. Metal nanoparticles released from dental implant surfaces: potential contribution to chronic inflammation and peri-implant bone loss. Materials (Basel). 2019 Jun;12(12). pii: E2036. doi: 10.3390/ma12122036.

Cal E, Cetintas VB, Boyacioglu H, Güneri P. Cytotoxicity of dental implants: the effects of ultrastructural elements. Int J Oral Maxillofac Implants. 2017 Nov/Dec;32(6):1281-7. doi: 10.11607/jomi.5962.

Daubert DM, Weinstein BF, Bordin S, Leroux BG, Flemming TF. Prevalence and predictive factors for peri-implant disease and implant failure: a cross-sectional analysis. J Periodontol. 2015 Mar;86(3):337-47. doi: 10.1902/jop.2014.140438.

[1] De acordo com estilo Vancouver.

Dawson DR 3rd, Jasper S. Key systemic and environmental risk factors for implant failure. Dent Clin North Am. 2015 Jan;59(1):25-39. doi: 10.1016/j.cden.2014.09.002. Epub 2014 Oct 7.

French D, Grandin HM, Ofec R. Retrospective cohort study of 4,591 dental implants: analysis of risk indicators for bone loss and prevalence of peri-implant mucositis and peri-implantitis. J Periodontol. 2019 Jul;90(7):691-700. doi: 10.1002/JPER.18-0236.

Godoy-Gallardo M, Wang Z, Shen Y, Manero JM, Gil FJ, Rodriguez D, et al. Antibacterial coatings on titanium surfaces: a comparison study between in vitro single-species and multispecies biofilm. ACS Appl Mater Interfaces. 2015 Mar 18;7(10):5992-6001. doi: 10.1021/acsami.5b00402.

Gordon O, Vig Slenters T, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, et al. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Oct;54(10):4208-18. doi: 10.1128/AAC.01830-09.

Hannigan A, Lynch CD. Statistical methodology in oral and dental research: pitfalls and recommendations. J Dent. 2013;41(5):385-92. doi: 10.1016/j.jdent.2013.02.013.

Heitz-Mayfield LJ. Diagnosis and management of peri-implant diseases. Aust Dent J. 2008 Jun;53 Suppl 1:S43-8. doi: 10.1111/j.1834-7819.2008.00041.x.

Heitz-Mayfield LJ, Aaboe M, Araujo M, Carrión JB, Cavalcanti R, Cionca N, et al. Group 4 ITI Consensus Report: risks and biologic complications associated with implant dentistry. Clin Oral Implants Res. 2018 Oct;29 Suppl 16:351-8. doi: 10.1111/clr.13307.

Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, Blinova I, Aruoja V, Suppi S, et al. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. PLoS One. 2014 Jul 21;9(7):e102108. doi: 10.1371/journal.pone.0102108.

Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, et al. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. J Clin Periodontol. 2015 Apr;42 Suppl 16:S152-7. doi: 10.1111/jcpe.12369.

Karatas O, Balci Yuce H, Taskan MM, Gevrek F, Lafci E, Kasap H. Histological evaluation of peri-implant mucosal and gingival tissues in peri-implantitis, peri-implant mucositis and periodontitis patients: a cross-sectional clinical study. Acta Odontol Scand. 2019 Nov 20:1-9. doi: 10.1080/00016357.2019.1691256. [Epub ahead of print].

Kassab CF. Citocompatibilidade de filmes nanoestruturados associados à prata aplicados sobre titânio: análise em cultura de osteoblastos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015.

Kheur S, Singh N, Bodas D, Rauch JY, Jambhekar S, Kheur M, et al. Nanoscale silver depositions inhibit microbial colonization and improve biocompatibility of titanium abutments. Colloids Surf B Biointerfaces. 2017 Nov;159:151-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.079.

Larson R, Farber B. Estatística aplicada. 6a ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall; 2016.

Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. J Dent. 2017 Jul;62:1-12. doi: 10.1016/j.jdent.2017.04.011.

Lindhe J, Meyle J, Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol. 2008 Sep;35(8 Suppl):282-5. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01283.x.

Mameno T, Wada M, Onodera Y, Fujita D, Sato H, Ikebe K. Longitudinal study on risk indicators for peri-implantitis using survival-time analysis. J Prosthodont Res. 2019 Apr;63(2):216-20. doi: 10.1016/j.jpor.2018.12.002.

Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. Periodontol 2000. 1998 Jun;17:63-76. doi: 10.1111/j.1600-0757.1998.tb00124.x.

Nascimento C, Nogueira Fernandes FHC, Teixeira W, Pedrazzi V. Iodoform and silver-coated abutments preventing bacterial leakage through the implant-abutment interfaces: in vitro analysis using molecular-based method. Arch Oral Biol. 2019 Sep;105:65-71. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.06.009.

Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. Clin Oral Implants Res. 2002 Feb;13(1):1-19. doi: 10.1034/j.1600-0501.2002.130101.x.

Renvert S, Persson GR, Pirih FQ, Camargo PM. Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: case definitions and diagnostic considerations. J Periodontol. 2018 Jun;89 Suppl 1:S304-S312. doi: 10.1002/JPER.17-0588.

Roccuzzo M, Layton DM, Roccuzzo A, Heitz-Mayfield LJ. Clinical outcomes of peri-implantitis treatment and supportive care: A systematic review. Clin Oral Implants Res. 2018 Oct;29 Suppl 16:331-50. doi: 10.1111/clr.13287.

Romanos G. Current concepts in the use of lasers in periodontal and implant dentistry. J Indian Soc Periodontol. 2015 Sep-Oct;19(5):490-4. doi: 10.4103/0972-124X.153471.

Salaie RN, Besinis A, Le H, Tredwin C, Handy RD. The biocompatibility of silver and nanohydroxyapatite coatings on titanium dental implants with human primary osteoblast cells. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2020 Feb;107:110210. doi: 10.1016/j.msec.2019.110210. Epub 2019 Oct 30.

Smanio JA. Ação antibacteriana de revestimentos nanoestruturados com partículas de prata aplicados em titânio frente a bactérias peri-implanto patogênicas. Análise *in vitro* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017.

Sobolev A, Valkov A, Kossenko A, Wolicki I, Zinigrad M, Borodianskiy K. Bioactive coating on Ti alloy with high osseointegration and antibacterial Ag nanoparticles. ACS Appl Mater Interfaces. 2019 Oct;11(43):39534-44. doi: 10.1021/acsami.9b13849.

Souza VZ, Manfro R, Joly JC, Elias CN, Peruzzo DC, Napimoga MH, et al. Viability and collagen secretion by fibroblasts on titanium surfaces with different acid-etching protocols. Int J Implant Dent. 2019 Nov;5(1):41. doi: 10.1186/s40729-019-0192-4.

Vilarrasa J, Delgado LM, Galofré M, Àlvarez G, Violant D, Manero JM, et al. In vitro evaluation of a multispecies oral biofilm over antibacterial coated titanium surfaces. J Mater Sci Mater Med. 2018 Nov;29(11):164. doi:10.1007/s10856-018-6168-8.

Wang R, Neoh KG, Kang ET, Tambyah PA, Chiong E. Antifouling coating with controllable and sustained silver release for long-term inhibition of infection and encrustation in urinary catheters. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015 Apr;103(3):519-28. doi: 10.1002/jbm.b.33230.

van Winkelhoff AJ. Antibiotics in the treatment of pri-implantitis. Eur J Oral Implantol. 2012;5 Suppl:S43-S50.

Yoshida K, Tanagawa M, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M. Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. Eur J Oral Sci. 1999 Aug;107(4):290-6. doi: 10.1046/j.0909-8836.1999.eos107409.x.

Zandim-Barcelos DL, Carvalho GG, Sapata VM, Villar CC, Hämmerle C, Romito GA. Implant-based factor as possible risk for peri-implantitis. Braz Oral Res. 2019 Sep 30;33 Suppl 1:e067. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0067.

Zhang T, Wang L, Chen Q, Chen C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. Yonsei Med J. 2014 Mar;55(2):283-91. doi: 10.3349/ymj.2014.55.2.283.

Zheng Y, Li J, Liu X, Sun J. Antimicrobial and osteogenic effect of Ag-implanted titanium with a nanostructured surface. Int J Nanomedicine. 2012;7:875-84. doi: 10.2147/IJN.S28450.

Zhu Y, Zhang CN, Gu YX, Shi JY, Mo JJ, Qian SJ, et al. The responses of human gingival fibroblasts to magnesium-doped titanium. J Biomed Mater Res A. 2020 Feb;108(2):267-78. doi: 10.1002/jbm.a.36813. Epub 2019 Oct 25.

ANEXO A - Comitê de Ética em Pesquisa DA FOUSP

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da citotoxicidade de filmes antimicrobianos nanoestruturados em componentes protéticos em implantes dentários: Análise em fibroblastos

Pesquisador: RAISSA MONTEIRO PADALKO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 92321918.1.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.745.573

Apresentação do Projeto:

Esse estudo busca avaliar a citotoxicidade em cultura primaria de fibroblastos de um revestimento com concentrações diferentes de prata e sílica aplicada ao titânio para a futura aplicação em componentes protéticos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a citotoxicidade em fibroblastos do revestimento nanoestruturado com prata aplicado à superfície de titânio para a futura aplicação deste revestimento em componentes de implantes dentários

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No há riscos, pois serão realizados apenas procedimentos que já seriam realizados respeitando o protocolo de instalação de implantes dentários.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os resultados dessa pesquisa poderá permitir a aplicação deste revestimento em componentes protéticos em implantes dentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os documentos necessários e o cronograma está adequado.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Corrigir erros de digitação no projeto básico.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1105220.pdf	25/06/2018 21:36:40		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	25/06/2018 21:33:11	RAISSA MONTEIRO PADALKO	Aceito
Outros	Justificativa.pdf	25/06/2018 21:30:43	RAISSA MONTEIRO PADALKO	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	25/06/2018 21:29:31	RAISSA MONTEIRO PADALKO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	aut_lab.pdf	25/06/2018 21:29:19	RAISSA MONTEIRO PADALKO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	aut_clinica.pdf	25/06/2018 21:29:09	RAISSA MONTEIRO PADALKO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	25/06/2018 21:28:48	RAISSA MONTEIRO PADALKO	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	25/06/2018 21:28:32	RAISSA MONTEIRO PADALKO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 29 de Junho de 2018

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:

Avaliação da citotoxicidade de filmes antimicrobianos nanoestruturados em componentes protéticos em implantes dentários: Análise em fibroblastos

Pesquisadora Responsável: Raissa Monteiro Padalko
Orientador: Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha
Colaboradores: Prof. Dr. Marcelo Munhóes Romano, Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, Prof. Dr. Carlos Alberto Adde, Roberta Bueno Machado de Campos
Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
Local: Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
Contato: (11) 3091-8030 ou (11) 3091-7813
Av.Prof.Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", CEP:05508-900

Convite para participação voluntária:

Você está sendo convidado (a) para participar, voluntariamente, ou seja, se você quiser, dessa pesquisa, e se em algum momento, desejar parar de participar, você tem total liberdade para retirar esse consentimento, sem prejuízo algum na continuidade do seu tratamento.

Objetivos do Estudo: O objetivo deste estudo é avaliar a citotoxicidade (compatibilidade) de um revestimento composto por prata e sílica aplicado à superfície de titânio, material do implante, com fibroblastos (células da região gengival); caso seja compatível iremos aplicar esse revestimento em componentes protéticos com intuito de diminuir a quantidade de bactérias ao redor dos implantes.

Procedimentos: Para obtenção das células para a pesquisa os fragmentos de mucosa queratinizada (gengiva) serão coletados durante o procedimento de instalação ou de reabertura do implante com auxílio de lâmina de bisturi. Esse fragmento de gengiva será coletado no momento da instalação do implante ou no momento da reabertura do implante para início da fase protética. Os procedimentos realizados, caso o/a senhor(a) aceite participar da pesquisa, serão exatamente os mesmos que já são realizados pelos profissionais da Faculdade de Odontologia da USP para a instalação do implante ou reabertura de implante e posterior instalação da prótese. A diferença é que o tecido retirado, que antes seria descartado, será utilizado para a pesquisa.

Riscos e desconfortos: Os riscos oferecidos são os mesmos de uma cirurgia de pequeno porte em gengiva, pois se trata de um procedimento que já seria realizado durante a instalação ou reabertura do implante sem alteração no protocolo.

Assistência em virtude de danos decorrentes da pesquisa: O (a) participante da pesquisa receberá assistência integral e imediata, de forma gratuita pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrente da pesquisa.

Rubrica do(a) participante da pesquisa

Rubrica do(a) pesquisador(a)

Indenização: O (a) participante da pesquisa tem direito a indenização em caso de danos decorrentes do estudo.

Tempo despendido: O tempo necessário para a realização dessa pesquisa será o mesmo que o (a) participante da pesquisa disponibilizaria para o atendimento clínico proposto no tratamento pelo qual o (a) senhor (a) procurou a clínica da faculdade.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos para o (a) participante da pesquisa, porém caso seja constatado que o revestimento analisado em laboratório não é tóxico para as células, futuramente, poderemos realizar a aplicação deste revestimento em componentes protéticos em implantes o que garantiria uma ação antimicrobiana local e maior durabilidade do mesmo.

Ajuda de custo: Caso o (a) participante da pesquisa necessite realizar visitas a faculdade apenas para a participação da pesquisa será fornecido o dinheiro referente ao transporte até a faculdade assim como outros gastos devido a essa visita.

Ressarcimento: As despesas que o (a) participante da pesquisa e seu (sua) acompanhante, exclusivamente, tiverem de locomoção e alimentação serão ressarcidos.

Garantia do sigilo da identidade do (a) participante da pesquisa: As informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. O (a) participante da pesquisa não será identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Desistência: O (a) participante da pesquisa tem o direito de desistir desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Reutilização dos dados: O (a) participante da pesquisa autoriza a utilização dos dados em outras pesquisas:

( ) NÃO autorizo a utilização de dados em outra pesquisa

( ) SIM autorizo a utilização de dados em outra pesquisa

Para utilizar os dados em outra pesquisa o(a) participante da pesquisa deseja ser consultado:

( ) NÃO quero ser consultado da utilização dos meus dados em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa

( ) SIM quero ser consultado da utilização dos meus dados em outra pesquisa

Se o/a senhor (a) participante da pesquisa tiver dúvidas quanto à ética da pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia:

CEP-FOUSP - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Avenida Professor Lineu Prestes nº 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP – Telefone (11) 3091.7960 – e-mail cepfo@usp.br. O horário de atendimento ao público e pesquisadores é: de segunda a sexta-feira das 9 às 12h e de 14 às 16h (exceto em feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012).

_____ _____

Rubrica do(a) participante da pesquisa Rubrica do(a) pesquisador(a)

"Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pela pesquisadora concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa"

São Paulo, _____de_____de _____

Participante da Pesquisa:

Nome:_____Idade:_____

Telefone:_____

Assinatura: _____

Pesquisadora responsável:

_____

Raissa Monteiro Padalko

ESTE DOCUMENTO FOI ELABORADO EM DUAS VIAS, UMA PARA O(A) PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL E OUTRA PARA O(A) PARTICIPANTE DA PESQUISA. O(A) PARTICIPANTE DA PESQUISA RECEBEU UMA VIA DO DOCUMENTO, ASSINADA E RUBRICADA POR ELE(A) OU REPRESENTANTE LEGAL E PELO(A) PESQUISADOR(A).

_____ _____

Rubrica do(a) participante da pesquisa Rubrica do(a) pesquisador(a)