

VICTOR ZACHARIAS MARTIN

**ADESÃO BACTERIANA SOBRE SUPERFÍCIE DE IMPLANTES E SEUS  
COMPONENTES**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção do título de Especialista em Implantodontia.

PIRACICABA

VICTOR ZACHARIAS MARTIN

**ADESÃO BACTERIANA SOBRE SUPERFÍCIE DE IMPLANTES E SEUS  
COMPONENTES**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção do título de Especialista em Implantodontia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Ricardo De A. Barbosa

PIRACICABA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Martin, Victor Zacharias, 1987-

M363a            Adesão bacteriana sobre superfície de implantes e seus  
componentes / Victor Zacharias Martin. -- Piracicaba, SP :  
[s.n.], 2013.

Orientador: José Ricardo De Albergaria Barbosa.

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

1. Implantes dentários. I. Albergaria-Barbosa, José  
Ricardo de, 1956- II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III.  
Título.

**Dedicatória,**

Dedico este trabalho á minha família, pelo carinho e compreensão em todos os momentos e aos valores passados, que compõem meu caráter e iluminam minhas escolhas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço meus pais pelo apoio e compreensão nos momentos de dúvida e dificuldade; minha mãe, exemplo na profissão e de conquistas; Ao Dr. Dario Adolfi e ao Dr. Maurício Adolfi pelos ensinamentos clínicos na área de prótese e periodontia, além do carinho e amizade conquistados ao longo desses anos. Agradeço aos mestres e funcionários da área de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial da FOP-UNICAMP, em especial aos Professores Márcio de Moraes, Luciana Asprino, Roger Moreira, a Didi e a Débora, pelos inúmeros ensinamentos dentro e fora do centro cirúrgico. A Dra. Márcia Leopoldo, pela companhia e pelo auxílio, nos diferentes casos cirúrgicos do consultório. Aos meus amigos do curso, pelos empréstimos de materiais, risadas e suporte. Ao meu parceiro Felipe Galoro, pela paciência e companheirismo sem iguais. Daniel Sundfeld Neto, pelo abrigo e irmandade há mais de sete anos, a Dra. Cindy Goes pela ajuda nos artigos. A Fernanda Owczarek, pela ajuda imprescindível na formatação e na correção deste trabalho e, acima de tudo, pela compreensão, amizade e amor em tudo que fazemos. E, agradeço á Deus por tudo, inclusive por colocar essas pessoas maravilhosas em meu caminho.

*“Viver é como andar de bicicleta: É preciso estar em constante movimento para manter o equilíbrio.”*

***Albert Einstein***

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>2 - REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>10</b>
2.1 A PRESENÇA DE BACTÉRIAS	10
2.2 MODULAÇÃO DA ADESÃO CELULAR PELA TOPOGRAFIA DA SUPERFÍCIE	11
2.3 MODULANDO A ADESÃO DA ADESÃO CELULAR PELA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE	13
2.4 MODIFICAÇÕES DE REVESTIMENTO	17
2.5 TOPOGRAFIA DE SUPERFÍCIE IRREGULAR/RANDOMIDAZA	20
2.6 SUPERFÍCIE MODELADA PADRONIZADA	22
2.7 ESTRUTURAS HIERÁRQUICAS DE SUPERFÍCIE	24
2.8 ADESÃO SOBRE MICRO IMPLANTES	25
2.9 ADESÃO DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i>	26
2.10 ADESÃO BACTERIANA SOBRE SUPERFÍCIES DE ZIRCÔNIA	26
<b>3 – DISCUSSÃO</b>	<b>29</b>
<b>4 – CONCLUSÃO</b>	<b>33</b>
<b>5 – REFERÊNCIAS</b>	<b>34</b>

## RESUMO

Com a consolidação do uso clínico dos implantes, as pesquisas se concentram nas características topográficas da superfície dos implantes, visando melhorar a qualidade da osseointegração e reduzir a adesão bacteriana, tentando assim prevenir infecções periimplantares, aumentando a longevidade do tratamento. Com o avanço da nanotecnologia e diferentes métodos para produzir rugosidade de superfície e de alterar sua composição química, muitos estudos foram realizados visando encontrar uma rugosidade e uma composição química ideal para os implantes. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre os diferentes métodos de modificação da superfície dos implantes quanto à topografia e à composição química destas e comparar os resultados das diferentes superfícies quanto à resposta celular e a adesão bacteriana. Foi observado que ainda não há um padrão ideal de superfície, pois diferentes espécies de bactérias se comportam de uma maneira diferente entre elas, e que muitas vezes características destas superfícies observadas *in vitro* não se repetem *in vivo*.

## ABSTRACT

With the consolidation of the clinical use of the dental implants, the research were focuses on the topographical features of the surface of implants, to improve the quality of osseointegration and to reduce bacterial adhesion, thus trying to prevent periimplant infections, to increase the longevity of the treatment. With the advance of nanotechnology and different methods to produce surface roughness and change their chemical composition, many studies were done, trying to find a pattern of ideal roughness and chemical composition for implants. The aim of this study was to conduct a literature review of the different methods of surface modification of implants, analyzing the topography and chemical composition of these and compare the results of different surfaces for the cellular response and bacterial adherence. It was observed that there is no ideal pattern surface, because different species of bacteria behave differently between them, and that is often observed that *in vitro* characteristics of these surfaces are not repeated in *in vivo*.

## 1 1 INTRODUÇÃO

O titânio e suas ligas vêm sendo utilizados como implantes, na área ortopédica e odontológica, graças as suas excelentes propriedades mecânicas e sua resistência á corrosão. Uma camada estável de óxidos se forma espontaneamente quando o titânio é exposto ao oxigênio e esta camada hidrofílica, confere biocompatibilidade á superfície (Neoh *et al.*, 2012).

A osseointegração foi utilizada para designar o contato direto entre osso vital e a superfície de um implante submetido à carga funcional. Novos conceitos surgiram, porém todos se reportam á união direta entre osso vital e a superfície do implante, em nível de microscopia óptica (Albrektsson *et al.*, 1983).

Com a consolidação do uso clínico dos implantes, as pesquisas se concentraram na melhoria dos já expressivos índices de sucesso. Dentre das várias linhas de pesquisa visando tais objetivos, as características topográficas da superfície sintética oferecida às células na interface osso/implante foram consideradas relevantes pela grande influencia na qualidade de osseointegração obtida (Schroeder *et al.*, 1981).

Existem vários métodos de texturização de superfície de implantes, sendo estes divididos em dois grandes grupos, os métodos de adição, produzindo superfícies rugosas ou porosas, normalmente obtidos através de spray de plasma com partículas de titânio ou hidroxiapatita, e os métodos de subtração, produzindo superfícies rugosas, normalmente obtidas por laser ou ataque ácido (Sycaras *et al.*,2000). Ainda há também, o método de oxidação anódica, para a obtenção de uma superfície porosa (Hall Lasusmas, 2000 TiUnite Nobel Biocare).

Pesquisas laboratoriais com cultura de células *in vitro* em superfícies metálicas e cerâmicas apontam para resultados significativamente positivos em adesão celular e resposta de deposição de matriz orgânica pelas células de fenótipo osteoblástico, resultando em expressiva diferença percentual em contato osso/implante (BIC) entre superfícies texturizadas e superfícies lisas (Kieswetter *et al.*,1996). A rugosidade representa uma modificação micro ou nano morfológica estrutural que aumenta a área de contato entre o osso mineralizado e o implante. (Suttler *et al.*,1988). A superfície texturizada aumenta a resistência ao torque de remoção e favorece a deposição óssea quando comparada à superfície lisa (Carr *et al.*,1997)

resultando que atualmente no mercado apenas implantes com superfície tratadas são comercializados.

Quanto ao índice de sucesso dos implantes, Noack *et al.* (1999) em um estudo retrospectivo, analisaram a sobrevivência de 1.964 implantes, de vários sistemas (Branemark, Frialit-1, Frialit-2, e IMZ), instalados em 883 pacientes e encontraram uma taxa de perda de 1,9% antes da instalação das próteses e 4,3% após o tratamento protético. Um dos principais motivos da perda dos implantes foi devido á destruição tecidual ao redor do implante.

Atualmente, são conhecidos dois tipos de doença perimplantar. A mucosite e a perimplantite. A mucosite perimplantar é o conjunto de alterações inflamatórias reversíveis, confinada a somente tecidos moles ao redor de um implante funcional. O acúmulo de placa bacteriana sobre a superfície do titânio por um período variando entre 7 e 21 dias leva a mucosite. (Brånemark *et al.*,1983). A perimplantite é caracterizada pela perda óssea ao redor dos implantes. Esta perda é creditada ao resultado do acúmulo de bactérias periodontopatogênicas, como AA, pg e PI, que podem infectar implantes e possuem potencial de destruição tecidual (Albrektsson *et al.*,1987).

É conhecido que o potencial de adesão entre a bactéria e a superfície do implante e seus componentes é controlada por vários fatores, incluindo propriedades físico-químicas das bactérias, da superfície e das condições ambientais que os envolvem (de Jonge *et al.*,2008).

O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre a relação entre a adesão bacteriana e a superfície dos implantes e seus componentes, levando em consideração diferentes tratamentos de superfície, composição química e grau de rugosidade.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A PRESENÇA DE BACTÉRIAS

A presença de bactérias pode complicar o processo de integração do implante ao tecido. Apesar de procedimentos antissépticos rigorosos, as infecções ainda podem acontecer (Moriarty *et al.*,2010). As fontes de bactérias incluem a atmosfera ambiente da sala de operações, o vestuário usado por profissionais médicos e cirurgiões dentistas e de bactérias presentes na pele do paciente (Hetrick *et al.*,2006).

Tem sido relatado que uma grande proporção de infecções relacionadas ao implante é causada por *staphylococcus* (aproximadamente 80%), e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) contam juntos 60% das infecções (Campoccia *et al.*,2006). Estas bactérias aderem e proliferam rapidamente em superfícies de titânio. A aderência inicial das bactérias em superfícies artificiais é o evento crítico na patogênese de infecções de corpo estranho. (Harris *et al.*,2004)

Parece que apenas uma dose baixa de inócuo é necessária para resultar na infecção de um implante. Em um estudo em *in vivo* verificou-se que 100 unidades formadoras (UFC) de *S. aureus* foram suficientes para infectar 95% dos implantes subcutâneos (Zimmerli *et al.*,1982). A frase "corrida para a superfície" foi criada por Gristina (1987) para descrever a competição entre a aderência bacteriana e integração tecidual.

É de se imaginar que a corrida está ganha pelas bactérias, as células dos tecidos não são capazes de deslocar estes colonizadores primários, e a formação de biofilme ocorre, levando à infecção. A formação de biofilme envolve diversas etapas, iniciando com a adesão bacteriana na superfície, seguida pela síntese de polissacarídeos extracelulares (EPS) pelas bactérias aderidas e agregadas em micro colônias, que evoluem para uma matriz tridimensional com canais internos (Trampuz *et al.*,2003).

Os EPS protegem as bactérias de agentes antimicrobianos e do sistema imunológico do hospedeiro, e essas regiões de nutriente podem causar a depleção de oxigênio, resultando que algumas bactérias podem entrar num estado de não crescimento, que as torna menos suscetível ao efeito de antimicrobianos de ação dependente do crescimento. Além disso, algumas bactérias podem diferenciar-se em um estado fenotipicamente resistente (Schachte *et al.*,2003).

Como resultado, biofilmes quando formados são muito difíceis de erradicar, e bactérias presentes em um biofilme podem ser mais resistentes a agentes antibacterianos do que os seus homólogos *in vitro* (Davies *et al.*,2003). Assim, a inibição da aderência bacteriana é frequentemente considerada como o passo mais crítico para evitar infecção associada ao implante, e para a osseointegração de um implante ser bem sucedida, a integração do tecido deve ocorrer antes da colonização bacteriana.

Um período de 6 horas após a instalação do implante foi identificado como sendo o "período decisivo". Quando o implante é particularmente suscetível à colonização, a prevenção da adesão bacteriana é essencial para o sucesso a longo prazo do implante (Poelstra *et al.*,2002).

Osteoblastos e células bacterianas variam bastante em tamanho, sendo esta diferença de tamanho mais importante que a topografia de superfície quanto à indução de sinais para o núcleo, resultando em mudanças de comportamento celular.

A resposta bacteriana em superfícies não é bem entendida, o que se sabe é que moléculas de adesina de superfície compostas por proteínas, tais como lectinas, flagelos, pili-fímbrias e outras, bem como carboidratos de superfície, desempenham um papel importante nas interações entre bactéria-superfície e bactérias-bactérias (Ploux *et al.*,2005).

Uma vez que o tamanho e a rigidez de osteoblastos e bactérias são diferentes, a ideia de usar a topografia de superfície para modular seletivamente a resposta destas células, parece ser atraente.

## 2.2 MODULAÇÃO DA ADESÃO CELULAR PELA TOPOGRAFIA DA SUPERFÍCIE

Existe uma infinidade de estudos sobre o efeito da topografia da superfície sobre as respostas bacterianas para a superfície. No entanto, como em destaque no estudo de Ploux *et al.* (2010), os resultados mostram variações significativas. Por exemplo, Whitehead *et al.* (2005) estudaram a adesão bacteriana em substratos com poços de diâmetros variando de 0,5 a 2 mm, e descobriram que o maior número de células foi mantido nas superfícies de diâmetro de tamanho maior.

Flint *et al.* (2000) relataram que a adesão bacteriana não pode ser relacionada ao aumento da rugosidade da superfície, embora topografia da superfície em torno de um tamanho crítico perto do diâmetro das células bacterianas pode reter bactérias. Por outro lado, Hilbert *et al.* (2003) não observaram influência da rugosidade de superfície variando entre 0,01 mm a 0,90 mm na fixação bacteriana, colonização e remoção. As variações na resposta

das bactérias a topografia de superfície, como descrito na literatura podem surgir, em parte, devido aos diferentes tipos de características topográficas e bactérias testadas, e a dificuldade em assegurar que a química de superfície permaneceu inalterada com as mudanças na topografia.

Um estudo *in vitro* examinou a adesão de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* em titânio convencional, titânio nanorugoso produzido por canhão de feixe de elétrons e titânio nanotubular e nanotexturizado produzido por dois processos de anodização diferentes (Puckett *et al.*,2010). Este estudo encontrou que, comparado ao titânio convencional (nanosmooth), a superfície nanorugosa de titânio diminuiu a aderência de todas as bactérias acima mencionadas, enquanto que titânio nanotubular e nanotexturizado resultou em um aumento de fixação bacteriana. A diferença na fixação bacteriana tem sido atribuída, em parte, à diferença na cristalização entre as superfícies. O óxido de titânio contido na superfície nanotexturizada e nanotubular é amorfo, ajudando a promover a fixação de bactérias (Del Curto *et al.*,2005). Enquanto que o nanorugoso e as superfícies convencionais continham TiO<sub>2</sub> cristalino.

Foi mostrado que a rugosidade de superfície também afeta a proliferação, diferenciação e a produção da matriz de osteoblastos, bem como a produção de fatores de crescimento e citocinas locais (Martin *et al.*,1995). Parece que a proliferação de osteoblastos depende de morfologias específicas, tais como dimensão fractal e de assimetria, não apenas rugosidade estatística (Rosales *et al.*,2010). A morfologia das células osteoblásticas em superfícies em nanoescala é modulada pelo formato, tal como mostrado pelo alongamento e alinhamento de tais células ao longo da direção de nanosulcos com a inibição de lateral expansão (Yang *et al.*,2009). Uma revisão dos dados *in vivo* a resposta do osso ao titânio foi avaliada por histomorfometria, torque de remoção, e testes de pushout/pullout, concluiu que a topografia da superfície influencia a resposta do osso em nível micrométrico, mas a influência em nível nanométrico parece ser menos segura (Wennerberg *et al.*,2009).

A grande maioria dos estudos para avaliar os efeitos da topografia de superfície na resposta das bactérias e osteoblastos foi realizado com uma bactéria ou osteoblasto, isto é, o mesmo substrato não era avaliado para os dois tipos de células. No entanto, algumas diferenças interessantes na resposta de osteoblastos e na resposta bacteriana ao mesmo tipo de superfície nanoestruturada foram recentemente relatadas. Wu *et al.* (2011) compararam o comportamento de *S. epidermidis* e osteoblastos humanos em quatro acabamentos de superfície de titânio clinicamente relevantes: cetim, lustrado, jateado e plasma-pulverizado.

Estas superfícies diferem não só por seus parâmetros de rugosidade vertical, mas também pelas escalas de comprimento laterais sobre a flutuação topográfica. Foi verificado que a adesão e crescimento do *S. epidermidis* é substancialmente maior sobre as superfícies de cetim e jateadas. Estas superfícies são mais grosseiras em escalas de comprimento em comparação as superfícies polidas ou de plasma pulverizado. Em contraste, os osteoblastos se difundiram significativamente mais e apresentaram uma atividade mais intensa da alcalina fosfatase (ALP) nas superfícies polida e plasma-pulverizado do que sobre a superfície de cetim. Estas superfícies são relativamente suaves em comparação com o tamanho de um osteoblasto (Ordem de dezenas de micrômetros), enquanto que a superfície acetinada é áspera nesta escala de comprimento.

Cólon *et al* (2006). compararam o comportamento de *S.epidermidis* e osteoblastos sobre nanoestruturas e microestruturas de óxido de zinco (ZnO) e TiO<sub>2</sub>. Descobriram que a adesão de *S. Epidermidis* na superfície de nanoestrutura de ZnO e TiO<sub>2</sub> foi menor do que a observada nas de microestruturas, enquanto que a adesão dos osteoblastos, atividade da ALP, e de deposição de cálcio mineral foram maiores na nanoestrutura de ZnO e TiO<sub>2</sub>. Estes resultados sugerem que a topografia da superfície dos implantes pode ser otimizada para minimizar a adesão bacteriana, porém estes tratamentos para a produção de efeitos topográficos podem também afetar a química de superfície, bem como a adsorção de proteínas. Foi observado que a topografia da nanosuperfície não afeta significativamente a adesão celular osteoblástica fetal humana na ausência de serum (Lim *et al.*,2005). As características da nanosuperfície podem afetar a absorção de proteínas, graças á falta de espaço para a absorção destas , enquanto que, se a superfície áspera for tratada como quimicamente homogênea, e se o tamanho das asperezas for maior do que a proteína, a rugosidade aumenta a área de superfície disponível para a adsorção de proteínas (Rosales *et al.*,2010). A conformação da proteína adsorvida pode também ser alterada pela nanosuperfície, que, por sua vez afeta o reconhecimento de sites específicos por integrinas de células (Lord *et al.*,2010). Assim, a diferenciação entre os efeitos diretos e indiretos da nanotopografia de superfície sobre as células e da adsorção de proteínas é de difícil compreensão.

### 2.3 MODULANDO A ADESÃO CELULAR ATRAVÉS DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE

Uma das maneiras em que a química da superfície de titânio pode ser modificada é a implantação iônica de  $\text{Ca}^{2+}$ . O titânio implantado obteve resultados superiores ao titânio comercialmente puro em promoção da formação óssea no fêmur de coelho (Hanawa *et al.*, 1997). No entanto, apresentou aumento da adesão de bactérias orais presentes na saliva, comparado ao titânio polido apesar graus semelhantes de rugosidade de superfície.

Este efeito foi atribuído à promoção da adsorção de proteínas na saliva. Por conseguinte, o implante de íon de cálcio foi considerado como um risco em promover a adesão nas superfícies expostas à cavidade oral, ainda que este tratamento seja benéfico na osseointegração dos implantes (Yoshinari *et al.*, 2000).

Superfícies com alterações aniônicas também podem afetar a adesão bacteriana e os osteoblastos como demonstrado por um estudo *in vitro* de *S. aureus* e osteoblastos. A aderência também é afetada em superfícies tratadas com polimetacrilato de metila (PMMA), terpolímeros com base de grupos carboxilato e sulfonato (Anagnostou *et al.*, 2006). O ensaio bacteriano com substrato de fibronectina revestida com PMMA alterada por terpolímeros  $\text{COO}^{\text{R}}$  ( $\text{COO}^{\text{R}}$ ), com R variando entre 0,5nm a 0,8nm, exibiram uma taxa de inibição na adesão de *S. aureus* entre 90% e 98%, em comparação com a adesão de PMMA sem alterações. Como as quantidades de fibronectina adsorvidas sobre os substratos de PMMA foram semelhantes, a inibição foi atribuída a interações específicas entre a fibronectina adsorvida e o carboxilato e os grupos sulfonato, e as mudanças conformacionais da fibronectina adsorvida, que impedem o acesso a ou a interação com receptores de adesina nas membranas das células de *S. aureus*. O carboxilato de etila e os grupos sulfonato também afetam a adsorção e a conformação da proteínas. Em meio de cultura de células, foi observada inibição da proliferação de osteoblastos em PMMA baseados em terpolímeros com R em torno de 0,6, mas não sobre os terpolímeros com de R entre 0.7 e 0.8. Uma investigação de implantes de liga de titânio com superfície modificada com polímeros que possuem grupos carboxilato / sulfonato, implantados em cômulo femoral de coelho, revelou que o sulfonato á 100%, ou proporções iguais de carboxilato e sulfonato promoveram a formação de osso (Kerner *et al.*, 2010). O aumento da proporção de grupos carboxilato resultou em diminuição do contato osso-implante, e foi especulado que a composição da superfície não só altera a absorção e conformação da proteína, mas também a estrutura transiente do coágulo de fibrina. No entanto, o efeito sobre a rugosidade de superfície pode não ser claramente delineado a partir da composição de superfície, uma vez que a superfície tiver sido modificada pelo processo de modificação por íons. Outro método para inibir a adesão bacteriana é modificar

superfícies com moléculas altamente hidratadas. Os mais usados são os revestimentos hidrofílicos baseados em polietilenoglicol (PEG) ou óxido de polietileno (PEO) (Nejadnik *et al.*,2008).

Os mecanismos de inibição são devido ao movimento dinâmico e a forte repulsão das cadeias de polímero hidratado. Polissacárideos hidrófilos, tais como o ácido hialurónico, também são eficazes na redução da adesão bacteriana (Pitt *et al.*,2004). Contudo, tal superfície hidrofílica também inibe a adesão de células de mamíferos (Subbiahdoss *et al.*,2010). Assim, para utilizar tais superfícies para mediar a disputa entre bactérias e os osteoblastos, algumas modificações para melhorar a adesão dos osteoblastos são necessárias. É possível usar fibronectina, uma proteína adesiva necessária para o receptor de integrina, melhorando a adesão celular e a proliferação em superfícies (Sousa *et al.*,2008), mas, infelizmente, muitas bactérias gram-negativas e gram-positivas também se ligam às proteínas extracelulares de células de adesão, incluindo fibronectina e fibrinogénio (Herrmann *et al.*,1988). Por exemplo, as bactérias normalmente associadas com infecções de implantes, *S. aureus* e *S. epidermidis*, têm adesinas que reconhecem a fibronectina, e se ligam diretamente às moléculas de fibronectina (Sinha *et al.*,2000).

No entanto, o RGD (Arg-Gly-Asp) modificado presente num certo número de proteínas, incluindo fibronectina e fibrinogénio é conhecido por interagir especificamente com os receptores de integrina da superfície celular, e não é reconhecida pelas bactérias, tais como *P. aeruginosa*, *Streptococcus mutans* (*S mutans*), *S. aureus* e *S. epidermidis* (Maddikeri *et al.*,2008). Assim, a modificação de superfícies com o RGD pode ser uma forma de melhorar as funções dos osteoblastos sem aumentar a adesão bacteriana. Este conceito foi ilustrado por uma série de pesquisas recentes sobre superfícies de titânio com o RGD modificados por polímeros hidrofílicos.

Harris *et al.* (2004) observaram superfícies modificadas por polímeros embebidos com poli L-lisina(PLL), polietilenoglicol e modificadas com RGD em substratos de TiO<sub>2</sub>, que a redução na aderência bacteriana foi semelhante nas superfícies contendo polímeros alterados com PLL e PEG. O número de bactérias aderentes sobre estas superfícies modificadas com PEG foi menor do que na superfície de TiO<sub>2</sub> não modificada. Superfícies de titânio modificado com escovas de contendo ácido polimetacrílico e sericina da seda, têm mostrado promover a adesão dos osteoblastos, proliferação e a actividade de ALP, enquanto que reduz a adesão de *S. aureus* e *S. Epidermidis* (Neoh *et al.*,2008). As escovas de ácido polimetacrílico fornecem propriedades anti-adesiva, e a sericina da seda, que compreendem

18 aminoácidos, com o ácido aspártico e serina sendo os componentes dominantes, aumentam as funções de osteoblastos, sem afetar significativamente a adesão bacteriana. Além de polímeros anti-adesivos, compostos bactericidas vem sendo utilizados para modificar a superfície do implante para reduzir os riscos de infecção. Implantes de titânio revestidos com poli (D, L-láctido), contendo 10% gentamicina foram testados *in vivo* (Vester *et al.*,2010). Os resultados mostraram que mais de 60% da gentamicina foi liberada dentro o primeiro minuto, resultando em uma concentração inicial de 50 mg de gentamicina por grama de osso, e 7,8 mg gentamicina/ g osso após uma semana.

Os testes *in vitro* com osteoblastos tipo SAOS-2 mostraram que estas células não foram afetadas negativamente pela gentamicina liberada do revestimento. Embora nenhum desenvolvimento de resistência foi observada com *S. aureus* exposto à gentamicina liberada, a possibilidade de contribuir para a propagação de organismos resistentes a antibióticos é uma preocupação. A quitosana, um polissacarídeo policatiônico com propriedades bactericidas (Raafat *et al.*,2008) e propriedades de aumento de função osteoblástica (Hamilton *et al.*,2007), tem despertado grande interesse para aplicações ortopédicas. Foram Avaliadas as funções de osteoblastos e a adesão bacteriana em substratos de titânio modificados com quitosano ( através de enxertia ou deposição de camada por camada) e modificações subsequentes pelos RGD (Chua *et al.*,2008). A camada de quitosano, independentemente da presença RGD, resultou na redução entre 70 e 80% na adesão bacetriana sobre a superfície do titânio. A densidade da superfície modificada pelo peptídeo RGD teve um efeito significativo na proliferação de osteoblastos e na atividade da ALP, e ambas as funções podem ser aumentadas de forma significativa sobre as células ao longo dos substratos cristalinos de titânio.

Embora que a RGD melhore as atividades dos osteoblastos, a falta de seletividade pode ser um problema (Morra *et al.*,2006). Assim, a atenção agora está cada vez mais dirigida para proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), uma classe de moléculas de sinalização conhecidas por promover a formação óssea, osteocondução e osteoindução (Harwood *et al.*,2005). Por as BMPs agirem localmente, a introdução direta no corpo não é desejável por causa do potencial efeitos adversos tais como a formação de osso ectópico indesejado. A BMP-2 adsorvida na superfície porosa dos implantes de titânio mostrou ter um efeito osteocondutor, e que é superfície e dose dependentes, num modelo ectópico de rato (Hall *et al.*,2007). Para substratos com BMP absorvido, um fator complicante é o ajuste da cinética da liberação, para atingir uma concentração ótima local. Diferente sítios anatômicos e espécies

animais podem exigir um perfil de liberação diferente, devido às taxas de recuperação (Li, 2001). Uma abordagem alternativa para usar BMPs para controlar as interações da superfície celular é imobilizar as BMPs na superfície do titânio através de ligações covalentes. Por exemplo, a polimerização do plasma de alilamina em Ti-6Al-4V foi usada para gerar uma superfície aminada e BMP-4 foi conjugada com os grupos amina utilizando carbodimida (Puleo *et al.*, 2002). O BMP-4 imobilizada induziu significativamente a atividade osteoblástica em células C3H10T1 / 2 pluripotentes. Para atingir o objetivo duplo de inibir a colonização bacteriana e melhorar as funções de osteoblastos, BMP-2 foi imobilizada sobre superfícies de titânio com um polímero anti-adesivo ou polímero bactericida como uma camada intermediária (Shi *et al.*, 2009). Com dextrano como a camada intermediária, a adesão de bactérias, bem como a função dos osteoblastos foi inibida. No entanto, com BMP-2, enxertada no dextrano, há uma densidade de superfície maior que 50 ng/cm<sup>2</sup>, a distribuição dos osteoblastos, a atividade de ALP e a deposição mineral de cálcio foram promovidos, sem diminuir a eficácia antibacteriana (Shi *et al.*, 2009). Carboximetilcelulose quitosano (CMCS) pode ser enxertada em titânio através de uma âncora de dopamina para servir como a camada intermediária bactericida. A adesão de *S. aureus* e *S. Epidermidis* foi reduzida em 80% em comparação à superfície primitiva, sem afetar a adesão dos osteoblastos (87). Após a junção de BMP-2 com o enxerto da camada de quitosano carboximetil, a eficácia antibacteriana permaneceu inalterada, enquanto a função osteoblástica, a atividade de ALP e deposição de cálcio, tanto dos osteoblastos, quanto das células-tronco mesenquimais derivadas da medula, foram promovidas (Shi *et al.*, 2009).

Recentemente, demonstrou que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), quando conjugado o CMCS ou ácido hialurônico enxertados em titânio, podem alcançar resultados semelhantes (88). A extensão da colonização bacteriana sobre a superfície de titânio com CMCS e VEGF é muito menor do que na do titânio primitivo. Concomitantemente, o VEGF mobilizada os osteoblastos, reforçando a distribuição e mineralização como mostrado pela cobertura densa de depósitos de cálcio. (Neoh *et al.*, 2012.).

## 2.4 MODIFICAÇÕES DE REVESTIMENTO

Lee *et al.* (2010) usou um dispositivo microfluídico para mostrar *Murina calvarial* MC3T3-E1 pré-osteoblástica co-cultivada com um número pequeno de cepas de *S.*

*epidermidis* inoculadas na superfície da liga de titânio TiAl6V4 antes da semente celular. Iodeto de propídio (PI) foi utilizado para detectar as células mortas ou danificadas 25 horas após a semente. Os resultados mostram claramente que o grau de danos celulares aumentou significativamente com o aumento da concentração de bactérias inóculas. A adesão inicial, propagação e proliferação dos osteoblastos não foram afetadas pela concorrência na superfície graças ao número relativamente pequeno de *S. epidermidis* (máximo de 1000 *S. epidermidis* co-cultivadas com 105 osteoblastos semeados). No entanto, a proliferação rápida das bactérias resultou no esgotamento de nutrientes, alterações do pH e/ou a geração e acúmulo de toxinas solúveis, ou seja, condições desfavoráveis para sustentar a viabilidade dos osteoblastos.

Subbiahdoss *et al.* (2009) investigaram a resposta de células de osteossarcoma U2OS semeadas no fundo de vidro de uma placa de câmara de escoamento, com diferentes densidades superficiais de cepas pré-aderidas de *S. epidermidis*. As células U2OS não cresceram na ausência de fluxo, possivelmente devido a envenenamento por endotoxinas bacterianas. Sob corrente, ambas as bactérias e as células U2OS cresceram, mas o número e a área de difusão por célula diminuiu com o aumento da densidade de bactérias aderidas. Experiências de fluxo de câmara semelhantes desenvolvidas por este grupo com TiO<sub>2</sub> revestido lâmina de vidro modificado com PEG ou PEG-RGD mostraram que na presença de biofilme, as células U2OS aderiram e espalharam sobre a cobertura PEG-RGD com maior significância do que na superfície de TiO<sub>2</sub>, mas sobre a superfície revestida de PEG, as células U2OS não aderiram nem espalharam independentemente da presença de biofilme. Em vista destes resultados, é observado que moléculas bioativas tais como a RGD conservaram a sua capacidade de aumentar a função de osteoblastos, mesmo na presença de bactérias aderentes.

Curiosamente, tem sido relatado que as cepas mortas de *S. Aureus* por raios UV podem servir como um osteocondutor de revestimento de superfícies de titânio (Somayaji *et al.*, 2010). Neste estudo de adesão, proliferação, síntese e matriz extracelular mineralizada de osteoblastos, foram medidos sobre superfícies de titânio revestidos com liga de fibronectina, com e sem as bactérias mortas por UV. A adesão de osteoblastos foi melhorada sobre as superfícies revestidas com bactérias em comparação com as superfícies não revestidas, já a proliferação celular, estava semelhante em ambas as superfícies. Marcadores de osteoblastos, como colágeno, osteocalcina, ALP e formação de nódulos mineralizados também foram aumentados nas superfícies revestidas com bactérias em comparação com as superfícies sem

revestimento. Foi concluído que a presença de bactérias mortas tornou a superfície mais rugosa, resultando em uma diferenciação melhorada de osteoblastos, e a presença de grupos hidroxila, sob a paredes das células *S. Aureus* facilita a deposição de íons de cálcio e de fosfato. Se estes postulados são válidos, pode-se imaginar que a utilização de um revestimento de polímero bactericida tal como CMCS sobre a superfície de titânio pode proporcionar vantagens semelhantes *in vivo* uma vez que as bactérias serão mortas pelo contato com a superfície.

Os testes *in vitro* para avaliar a eficácia de superfícies modificadas em inibição da adesão bacteriana são muitas vezes realizados com as bactérias em tampão fosfato salino (PBS). No entanto, um implante inserido no corpo irá encontrar proteínas. É geralmente aceito que a adsorção de proteínas pode ser afetada por nanotopografia (Rechendorff *et al.*,2006), embora alguns estudos relataram que nanotopografia tem pouco efeito sobre a adsorção de proteínas (Cai *et al.*,2006).

Mesmo que uma superfície do implante pode ser concebida com nanotopografia para otimizar as funções de osteoblastos, minimizando adesão bacteriana *in vitro*, a presença de diferentes tipos de proteínas e a natureza dinâmica do ambiente *in vivo* pode comprometer sua eficácia. Absorção de proteínas também é afetada pela presença de superfícies modificadas quimicamente. Por exemplo, as superfícies modificadas por polímeros hidrófilos, tais como aqueles baseados em PEG podem inibir a adesão bacteriana, mas podem alterar a absorção de proteínas (Dalsin *et al.*,2005), a adesão dos osteoblastos na superfície pode também ser prejudicada, a menos que outra modificação seja feita com moléculas bioativas tais como RGD, ou factores de crescimento, como descrito acima.

A estabilidade das porções de superfície é outro motivo de preocupação, mas atualmente apenas dados limitados estão disponíveis. Os revestimentos de polímeros bactericida depositados sobre o titânio através da camada-por-camada electrostática ou enxerto de dopamina baseados em grupos de ancoragem têm mostrado que conservam a sua eficácia após imersão prolongada em PBS. Da mesma forma, os factores de crescimento (BMP-2 e VEGF) covalentemente conjugado com revestimentos poliméricos de titânio, não vazam depois imersão em PBS ou meio de cultura de células durante 14 dias. No entanto, para as aplicações *in vivo*, estas superfícies modificadas têm de ser submetidas a esterilização antes da utilização. Estudos recentes mostraram que as dopaminas baseadas em grupos de ancoragem são estáveis após tratamento em solução de etanol á 70% durante 1 hora, bem como após a autoclavagem á 121 C durante 20 minutos. Os resultados preliminares indicam

que a BMP-2 conjugada com estes revestimentos CMCs depois de terem sido submetidas a tratamento em autoclave e ao etanol são capazes de aumentar a mineralização das células cultivadas sobre estes substratos. Isto pode ser bastante surpreendente, pois a BMP-2 em sua forma livre perde sua bioatividade em condições de autoclave. No entanto, a bioatividade de BMP-2 adsorvida em substratos foi reduzida após aquecimento á 100 C por 30 minutos, o que foi atribuído à geração de uma grande camada insolúvel de proteína bioativa, como resultado do tratamento térmico (Winkler *et al.*,2006).

Outro problema de estabilidade são os efeitos da fricção e manuseio durante implantação sobre as porções de superfície de implantes modificados com proteínas ou revestimentos em nanoescala. Por fim, existe a incerteza dos efeitos da degradação para estas superfícies modificadas com revestimentos de polímeros e fatores de crescimento(Wiemann *et al.*,2002).

Crawford *et al.*(2012) estudaram que o potencial de adesão entre bactérias e a superfície dos implantes é controlada por vários fatores, incluindo as propriedades físico/químicas das bactérias, da superfície e as condições do meio onde a adesão acontece. Com os parâmetros de meio estabelecidos, qualquer diferença no grau de adesão será dada pelas propriedades da superfície do material. Atualmente, é estudado o papel que a topografia da superfície realiza no processo de adesão, pois duas amostras de superfície quimicamente idênticas, colonizadas pelas mesmas cepas, podem exibir um padrão de adesão completamente diferente, graças a arquitetura e a rugosidade desta superfície.

Segundo Crawford, a arquitetura da superfície pode ser classificada em três grandes grupos, superfícies irregulares/randomizadas, superfícies regularmente modeladas e superfície de estrutura hierárquica.

## 2.5 TOPOGRAFIA DE SUPERFÍCIE IRREGULAR/RANDOMIZADA

As investigações sobre o impacto de características de superfície aleatórias sobre a adesão bacteriana foram realizados durante pelo menos 30 anos (Harris *et al.*,2004), mas ainda não há um entendimento claro de como esses recursos aleatórios podem modular a colonização. A avaliação matemática de topografia de superfície é crítica, especialmente no caso de superfícies de forma de padrão irregular, para compreender como as dimensões topográficas exercem uma influência na adesão bacteriana.

Em um trabalho, a rugosidade média aritmética (Ra) de padrões irregulares de titânio polido foi avaliada utilizando um perfilômetro de caneta (An *et al.*, 1995). De acordo com este estudo, a topografia de superfície com Ra de 1,25-0,43  $\mu\text{m}$  não teve impacto significativo sobre a adesão de *S. epidermidis*.

Em um estudo similar, a AFM foi utilizada para avaliar três parâmetros topográficos, aspereza, rugosidade média e máxima (Boulangé *et al.*, 1997). Nenhuma relação clara entre qualquer um destes parâmetros de rugosidade e o número de células aderidas da cepa de *Streptococcus termophilus* na superfície foi encontrada. Além disso, a análise de rugosidade foi realizada em perfil de linha individuais, o que pode não refletir adequadamente a topografia da superfície tridimensional. Estudos de topografia com características sub-mícron relataram que houve baixa adesão bacteriana sobre as superfícies de aço inoxidável com uma média rugosidade de 0,16  $\mu\text{m}$  medido sobre uma área de varredura 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ , enquanto superfícies mais lisas ou mais ásperas exibiram graus maiores de bactérias aderidas. Este trabalho também demonstrou que a adesão bacteriana ocorreu preferencialmente ao longo das ranhuras sub-micrométricas. O caracterização da rugosidade neste trabalho foi muito simplista, o único parâmetro topográfico relatado foi a rugosidade média. A análise mais abrangente sobre rugosidade foi demonstrada por Frojd *et al.* (2010) quando usaram perfilometria óptica para avaliar a rugosidade média, densidade de característica de superfície e área de superfície de 50  $\text{mm}$  x 50  $\mu\text{m}$  de cortes de superfície de titânio. Para avaliar o nível de adesão bacteriana nestas superfícies de titânio, o volume do biofilme resultante foi determinado. O volume de biofilme foi observado sendo mais elevado em titânio, do que as topografias que exibiram maior área de superfície e rugosidade média. Uma rugosidade média de 10-15  $\text{nm}$  sobre áreas escaneadas de 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$  tem sido relatada a ser inversamente correlacionada com a número de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e as células de *Escherichia coli*, que aderem à superfície do titânio.

A superfície nanotopográfica também foi relacionada em estimular as atividades metabólicas das bactérias e a quantidade de polissacarídeos extracelulares (EPS) produzidos encontrados foi maior do que em superfícies mais suaves de titânio. Uma tendência semelhante foi observada em outros estudos em que superfícies de vidro gravadas com nanoarquitetura, com uma média de rugosidade 1,3  $\text{nm}$  atraíram mais células de bactérias do que superfícies comuns de vidro com uma média rugosidade de 2,1  $\text{nm}$  (Mitik *et al.*, 2009). Neste trabalho, as rugosidades foram avaliadas utilizando AFM sobre áreas de exploração 5  $\text{mm}$  x 5  $\mu\text{m}$ . Os níveis de adesão de cada uma das cepas bacterianas parecem estar

inversamente correlacionada com a rugosidade da superfície. Como são o caso com os estudos correlacionando as interações celulares com microtopografia de superfície, as tentativas para caracterizar o efeito que nanotopografias particularmente suaves desempenham na adesão bacteriana também obtiveram resultados inconsistentes e contraditórios.

Características de superfície com uma rugosidade média inferior a 1,5 nm mostraram que afetam o comportamento da adesão e os níveis de produção de EPS de *S. Aureus* e *P. aeruginosa* (Truong *et al.*,2010). A adesão das células e produção de EPS aumentaram para ambas as cepas em superfícies de titânio com menor rugosidade média, enquanto que em superfícies de titânio polido granel com rugosidade decrescente melhorou o comportamento adesivo apenas da *P. Aeruginosa*, enquanto que o *S. aureus*, exibiu propensão diminuída para aderência. Por outro lado, filmes de titânio liso sobre silicone contendo uma média de rugosidade abaixo de 0.5 nm mostraram aumentar o comportamento adesivo e a produção de EPS de *S. aureus*, mas não para Células de *P. aeruginosa*. Foi sugerido que as diferenças de perfil de adesão molecular destas duas bactérias sobre películas lisas eram em função das variações na deformabilidade das células resultantes de suas morfologias.

## 2.6 SUPERFÍCIE MODELADA PADRONIZADA

Adesão bacteriana em topografias de superfície irregular tem sido extensivamente estudadas, utilizando uma grande variedade de superfícies, mas o comportamento da adesão bacteriana em topografias regularmente modeladas em micro e nanoescala recebeu menos atenção. Vários padrões em microescala, incluindo ranhuras gravadas, poços, quadrados e superfícies inspiradas na pele de tubarão tenham sido fabricadas com a finalidade de desenvolver superfícies anti aderentes para as bactérias (Chung *et al.*,2007).

Rowan *et al.*(2002)fabricaram superfícies planas com currais quadrados distribuídos uniformemente, com cerca de 10 um de diâmetro, que foram capazes de prender as células de *E. coli*. Da mesma forma, Rozhok *et al.*(2006) fabricaram superfícies contendo 3 furos um com a profundidade de 0,5 m, onde também foram capazes de localizar células isoladas de *E. coli*. No entanto, ambos os estudos não contribuem substancialmente para a compreensão fundamental dos fatores topográficos envolvidos na ligação de células de modulação, uma vez que tanto um quanto outro, foram utilizados superfícies química de polietileno glicol ou poli-L-lisina para dirigir a fixação bacteriana.

Um teste mais abrangente de um único tipo de superfície modelada foi recentemente realizado, na qual as matrizes regularmente espaçadas de saliências quadradas com dimensões controladas fabricadas sobre superfícies de PDMS foram testadas quanto à sua capacidade de controlar a adesão de *E. coli* e formação de biofilmes (Hou *et al.*, 2011). As dimensões da superfície foram sistematicamente variadas, com o comprimento das saliências que variaram entre 2 e 100 µm, com a distância entre as características adjacentes variando entre 5 e 20 µm. Foi descoberto que as células de *E. coli*, preferencialmente se aderem e produzem biofilme nos vales entre as saliências quadradas de todas as dimensões testadas, indicando que a forma padrão de quadrado com microtopografia, pode promover a adesão bacteriana e formação de biofilme. No entanto, este estudo foi limitado, pois a análise foi realizada numa rugosidade mínima, e, portanto poucas conclusões poderiam ser tiradas como a mediação de adesão celular pela topografia. Apesar da falta de caracterização da rugosidade abrangente, na maioria dos estudos de microescala com superfícies estampadas, eles demonstram consistentemente um ponto importante. Superfícies estriadas e sem protuberâncias, em particular demonstram claramente a importância de 'abrigo' para bactérias de forças do exterior (turbulência hidrodinâmica, por exemplo), que podem de alguma forma, desalojar as células aderidas. Experiências de fluxo, utilizando culturas de *Pseudomonas fluorescens* e *P. aeruginosa* em superfícies estriadas retangulares de silício de várias dimensões, mostraram que a ligação preferencial ocorreu nas extremidades a jusante das ranhuras, em que as células poderiam se alojar e não poderiam ser facilmente removidas. Poços gravados têm mostrado proporcionar abrigo para as células de uma maneira semelhante (Whitehead *et al.*, 2005).

Uma investigação do comportamento de fixação de *S. aureus* e *P. Aeruginosa* em superfícies com um diâmetro entre 0,2-2 µm, mostrou que quanto maior diâmetro dos poços, melhor para as células, e que a menor célula, com formato de *coccus*, as células de *S. aureus* foram mantidas em números maiores do que as de formato maior, *P. Aeruginosa*, em forma de bastonete. Em nanoescala, várias tentativas foram feitas para simplificar o padrão de superfície e a resposta de aderência de bactérias sobre várias superfícies (Díaz *et al.*, 2010).

Matrizes de polímero de amplo aspecto em nanoescala têm sido relatadas por conduzir o comportamento de adesão de *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e células de *E. coli* (Hochbaum *et al.*, 2010). Os postes foram produzidos com um diâmetro de 300 nm e de altura de 2 nm, e foi observado que as bactérias se organizaram em padrões definidos de acordo com a matriz subjacente. Mesmo em superfícies de arquitetura quase-aleatória, as células

bacterianas têm uma tendência de se orientarem com os padrões existentes naturalmente. Por exemplo, experimentos envolvendo localização bacteriana realizada sobre uma superfície de substrato de ouro nanoestruturada aleatoriamente, foram descobertos que na superfície "aleatória" células de *P. Fluorescens* se agregaram ao longo dos nanocanais que foram definidos como arestas de estruturas de cristais. Como em superfícies irregulares, não há dados conflitantes apresentados na literatura que descrevam a relação entre as superfícies modeladas e a adesão bacteriana.

Mitik-Dineva *et al.* (2010) observaram que os poços com um diâmetro de 2,5 um gravados na superfície de fibra óptica, tendem a impedir a fixação de bactérias, em relação à superfície controle de fibra óptica. Diâmetros diferentes (20 nm, 40 nm, 60 nm e 80 nm) de nanotubos de titânio criados por anodização tem mostrado que afetam o grau de aderência de células de *S. epidermidis* e células de *S. aureus*. Os resultados mostraram que o número de células vivas foi reduzido em todas as estruturas de 20 nm nanotubulares excepto para *S. epidermidis*, ou em 60 nm e 80 nm para *S. aureus*.

## 2.7 ESTRUTURAS HIERÁRQUICAS DE SUPERFÍCIE

Os padrões de superfície hierárquicos mais estudados até à hoje vem, ou foram inspirada na natureza (Bliznakov *et al.*, 2009). Há uma escassez de dados na literatura relativos à aderência bacteriana para estas superfícies naturais. Sabendo que superfícies hierárquicas como estas são frequentemente hidrofóbicas e possuem capacidade de auto-limpeza, mais pesquisas são, certamente justificas. Como tal, esta seção irá detalhar o trabalho que tem sido realizado até o momento a investigar a adesão bacteriana sobre superfícies hierárquicas. As investigações sobre a adesão celular em superfícies hidrofóbicas e hierárquicas foram, em sua maioria, realizadas em um enfoque para compreender o potencial destas superfícies de minimizar ou prevenir a colonização de bactérias. A razão para isso é que o ar aprisionado entre as superfícies de características de dupla escala presentes, limita a superfície de área de contato disponível para as bactérias.

Ma *et al.*, (2011) estudaram a adesão das bactérias sobre a superfície hierárquica natural de folhas de taro e confirmaram que a superfície resistiu á fixação bacteriana.

Investigação da adesão bacteriana em superfícies hidrofóbicas artificiais de elastômeros de silicone apresentaram resultados semelhantes, onde os níveis de adesão bacteriana foram reduzidos (Crick *et al.*, 2011).

Fadeeva *et al.*(2011) recentemente investigou a extensão da retenção bacteriana em amostras de titânio que haviam sido modificados para imitar a superfície de característica dual-escala da folha de lótus (*Nelumbo nucifera*). A superfície foi feita em microescala, grão-like, com protuberâncias convexas que variaram de 10 um-20, emcoberto com ondulações em nanoescala de 200 nm ou menos. Os resultados mostraram que as células de *P. aeruginosa* foram incapazes de colonizar a superfície (isto é, todas as células presentes estavam abaixo do limite de detecção), no entanto as células de *S. Aureus* conseguiram colonizar a superfície. Os resultados deste trabalho levantaram um ponto interessante, que a adesão celular em superfícies hidrofóbicas talvez não seja tão simples como era inicialmente imaginado, e que as propriedades de auto-limpeza de algumas superfícies podem não ser suficientes para impedir a adesão bacteriana.

## 2.8 ADESÃO SOBRE MICROIMPLANTES

Os micro implantes se tornaram muito populares na comunidade ortodôntica nos últimos anos como dispositivos de ancoragem esquelética (Kanomi *et al.*,1997). Ao contrário dos implantes osseointegrados convencionais, a osseointegração completa não é nem esperada nem desejada nestes sistemas de ancoragem. Apesar do número de falhas de micro implante ser baixo, a esfoliação de micro implantes sem intercorrências, seguida de cicatrização, ocorre clinicamente, com certa frequência. Isto parece ser o resultado de estresse oclusal extenso ou de infecções ao redor do biomaterial, que ocorrem apesar da higiene oral e do extenso uso de enxaguatórios bucais antimicrobianos (Heitz *et al.*,2004).

O aço inoxidável, assim como o titânio (Ti) e as suas ligas são comumente usados como matérias dos micro implantes. Eles são conhecidos por suas boas propriedades mecânicas, de alta resistência à corrosão, excelente biocompatibilidade (Carlsson *et al.*,1986).

Chin *et al.*(2007) demonstraram que a formação de biofilmes nas superfícies de micro implantes não foi alterada pela matéria prima do parafuso, feito em diferentes ligas de titânio ou aço inoxidável, ou pelos metais pesados encontrados na superfície de óxidos destes e que a contaminação de superfície parece ser agravada quando esta superfície é submetida á procedimentos de esterilização. Concluíram também, que a exposição *in vitro* de bochechos de clorexidina e de fluoreto não reduziu significativamente a quantidade de biofilme sobre os diferentes tipos de sistemas de micro implantes, mas diminuíram a viabilidade do biofilme em até 80%.

## 2.9 ADESÃO DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*

As bactérias implicadas em peri-implantite são principalmente aquelas associadas com a doença periodontal e incluem bactérias estritamente anaeróbias, tais como *Porphyromonas gingivalis*. (Albrektsson & Isidor 1994).

Pier-Francesco *et al.* (2006) observaram que a rugosidade de superfície alterou o nível de adesão bacteriana, onde a superfície mais lisa (rugosidade média de 34.57nm) obteve uma adesão muito menor do que as outras três superfícies (estas variando entre 155 a 449nm), e que não houve diferença significativa entre estas outras três superfícies no nível de adesão bacteriano e que não houve diferença significativa na adesão bacteriana entre superfícies hidrofóbicas, hidrofílicas e superfícies não modificadas.

## 2.10 ADESÃO BACTERIANA SOBRE SUPERFÍCIES DE ZIRCÔNIA

Zircônia parcialmente estabilizada (óxido de zircônio) é utilizada na fabricação de implantes dentários e componentes, devido à sua capacidade a osteointegração, boa biocompatibilidade, alta resistência à compressão e resistência à propagação de trincas. Esteticamente é também vantajosa, já que a cor branca pode eliminar os problemas de coloração azulada sobrejacente na gengiva que podem ocorrer quando as partes de um implante metálico estão perto do tecido gengival, ou quando eles são expostos devido à perda óssea e recessão gengival. De uma maneira semelhante, pacientes solicitam próteses e implantes metal-free para estética e por outras razões. (Langhoff *et al.*, 2008)

A zircônia gera um óxido não-reabsorvível e bioinerte, que tem boas propriedades mecânicas. Ele compartilha estas mesmas características com titânio, por exemplo, ambos são um metal ativo com uma camada de óxido sobre a sua superfície, que resulta em uma boa resposta das células ósseas e osteointegração. A biosegurança, biocompatibilidade da zircônia e a interação osso/zircônia têm sido estudadas. (Wenz *et al.*, 2008) A interação celular com a zircônia foi também estudada.

Rimondini *et al.* (2002) em seu estudo sobre colonização bacteriana, observaram muitas células ectópicas epiteliais sobre as superfícies de zircônia, o que sugere que a zircônia poderia ser um material promissor, capaz de aumentar a fixação epitelial.

Diferentes afinidades de aderência bacteriana e formação diferente de biofilmes têm sido relatadas para vários materiais diferentes, e foi relatado que a zircônia têm a

capacidade de inibir o nível de colonização bacteriana em sua superfície. (Manicone *et al.*,2007)

Rimondini *et al.* (2002) estudaram a adesão bacteriana em titânio e em dois tipos de superfícies de zircônia diferente e eles relataram que ambas as superfícies de zircônia tiveram significativamente menos bactérias do que a superfície de titânio nos seus experimentos *in vivo*. Resultados semelhantes foram obtidos quando Scarano *et al.* (2004) compararam superfícies de zircônia e de titânio com rugosidade semelhante.

Radha *et al.* (2012) compararam superfícies de zircônia (PZ), de titânio (PT), titânio jateado com zircônia (TBZ) e titânio jateado com zircônia e submetido a ataque ácido (TBZA), com rugosidade padrão de todas as amostras abaixo de 0.2µm. Foi observado que a molhabilidade de superfície TBZA teve diferença significativa comparado com todas as outras superfícies resultando em uma superfície fortemente hidrofóbica. Superfícies PZ e TBZ apresentaram valores relativamente similares de ângulo de contato, com diferenças significativas com a superfície PT. Ambas as superfícies PZ e TBZ apresentaram menor energia livre de superfície do que o controle PT. A exploração para a determinação da composição química mostrou que tanto na superfície de PZ e na superfície TBZ, houve a presença de oxigênio, carbono e zircônia como componentes principais, enquanto que a superfície de PT e TBZA apresentaram oxigênio, titânio e carbono como componentes principais. Tanto as superfícies de PZ quanto às superfícies TBZ apresentaram menor percentual de adesão bacteriana de *P. Nigrescens* e *S. Mitis*, do que a superfície de PT, e o revestimento destas superfícies com saliva resultou em significativa redução da aderência de bactérias.

A capacidade da zircônia em diminuir a adesão bacteriana pode ser atribuída a sua SFE inferior, e Quirynen Bollen (1995) descobriu que a energia de superfície maior, atrai mais bactérias. O percentual significativamente menor na aderência de *S. mitis* para PZ e TBZ indicaram que estas bactérias têm menos afinidade para aderir a superfícies de zirconia do que a superfície de titânio. Uma aplicação clínica importante é, através da utilização de zircônia em pacientes suscetíveis a perimplantite, reduzir o número de bactérias aderidas e, subsequentemente, diminuir a probabilidade de desenvolvimento de infecção peri-implantar. Uma vez que o implante dentário é exposto à cavidade oral, uma película adquirida é criada em sua superfície a partir de saliva. Esta película age como uma interface entre as bactérias iniciais como Espécies de *Streptococcus* e a superfície do implante. No estudo, as superfícies

revestidas por saliva resultaram na significativa redução da adesão bacteriana; aparentemente o tipo de proteína salivar adsorvido pelas superfícies resultou num efeito protetor a estas.

Vários estudos referiram o efeito anti-adesivo de algumas proteínas salivares na adesão bacteriana e documentaram o efeito protetor de algumas proteínas na saliva contra adesão bacteriana (Wakabayashi *et al.*,2009). A presença de tal tipo de proteína na composição da película pode conduzir a criação de uma superfície que diminui adesão bacteriana e, conseqüente, diminui as infecções perimplantares e a perda de implantes. (Lima *et al.*,2008)

Cada material de implantes dentários possuem químicas distintas e propriedades energéticas de superfície, que fornecem padrões distintos de adsorção de proteínas e subsequente na adesão bacteriana (Sardin *et al.*,2004).

É acreditado que a superioridade da zircônia em relação á redução da aderência de bactérias, é relacionada à sua SFE baixa. O efeito da SFE afeta diretamente a camada de película de saliva formada, a qual afeta a adesão microbiana, direta ou indiretamente, afetando o tipo de proteínas aderidas ao substrato (Absolom *et al.*,2000).

### 3 DISCUSSÃO

O sucesso do tratamento de implantes dentários é regido pela resposta celular às características da superfície dos implantes. Nos estudos de Radha *et al.*,(2012) os resultados destacam o efeito da molhabilidade de superfície dependente do tipo de material. Isto pode ser interpretado pela ausência de diferenças significativas entre as superfícies PZ e TBZ, pois estas duas superfícies têm uma elevada percentagem de zircônia em sua superfície. Na análise, pode-se notar que a superfície de titânio com partículas de zircônia (superfície TBZ) conduziu um aumento significativo no valor do ângulo de contato comparado a sua superfície original (PT) e a única diferença entre estas duas superfícies é a presença de partículas de zircônia. Este efeito pode não estar relacionado com a rugosidade da superfície, pois ambas as superfícies tinham a rugosidade relativa igual. No entanto, houve uma diferença significativa no valor do ângulo de contato entre as duas superfícies.

É conhecido que um aumento da rugosidade da superfície conduz o aumento da adesão bacteriana através do fornecimento de abrigo dentro das irregularidades da superfície. Quirynen *et al.* (1993) mostraram uma clara relação entre o acúmulo de placa e a rugosidade da superfície. Portanto, para ser capaz de avaliar outras características de superfície, a rugosidade da superfície foi padronizada inferior a 0,2 mm, uma vez que tem sido demonstrado anteriormente, que esta rugosidade não tem um efeito sobre a adesão de bactérias, pois a maioria das bactérias são maiores em tamanho.

Apesar de tanto as superfícies PZ e TBZ que apresentaram menores porcentagens de células aderidas de *S. mitis* do que a superfície PT sem película de saliva é interessante notar a diferença na adesão bacteriana, que diminui depois de jatear a superfície PT com partículas de zircônia (superfície TBZ) e, aumenta quando estas partículas de zircônia são removidas por ataque ácido (superfície TBZA), o que indica que a redução é devida à presença de zircônia na sua superfície. A capacidade de zircônia de diminuir a adesão bacteriana pode ser atribuída a sua SFE inferior, e Quirynen Bollen(1995) descobriu que a energia de superfície maior atrai mais bactérias. O percentual significativamente menor na aderência de *S. mitis* para PZ e TBZ indicou que estas bactérias têm menor afinidade para aderir a superfícies de zircônia do que na superfície de titânio, tendo aplicação clínica importante para aumentar o índice de sucesso através da utilização de zircônia em pacientes

suscetíveis a peri-implantite, reduzindo o número de bactérias aderidas e, subsequentemente, diminuindo a probabilidade do desenvolvimento de infecções.

Uma vez que o implante dentário é exposto à cavidade oral, uma película adquirida é criada em sua superfície a partir da saliva. Esta película atua como uma interface entre as bactérias iniciais como espécies de *Streptococcus* e a superfície do implante. No estudo sobre corrente de revestimento, as superfícies com saliva mostraram uma redução significativa da adesão bacteriana; parece que o tipo de proteína salivar adsorvido pelas superfícies resultou num efeito protetor.

A Topografia de superfície possui uma consideração importante no implante dental, especialmente quando estas superfícies são desenvolvidas para aumentar a sua eficácia *in vitro*. A modulação topografia da superfície no desenho do implante biomédico tem sido principalmente realizada com o objetivo de otimizar a osseointegração, capacidade de carga e outras tensões mecânicas (Liu *et al.*, 2004).

Os parâmetros topográficos mais comumente modificados buscam melhorar o implante mecanicamente e biologicamente. Por exemplo, a redução do perfil de rosca com o aumento do número de fios por unidade de área foi realizada para melhorar a resistência do implante e para aumentar a estabilidade óssea inicial. As características macroscópicas-em superfícies de implantes são na sua maioria necessárias para ancoragem e apoio durante o procedimento de implantação. As características em nanoescala em superfícies de implantes têm sido utilizadas para estimular o ambiente biológico, influenciar o substrato de células e suas-interações com a superfície (Le Guéhennec *et al.*, 2007). As maiorias dos trabalhos realizados nesta área centraram-se na investigação sistemática das interações entre as células eucarióticas e as superfícies dos implantes, no entanto, há uma falta de estudos para esclarecer especificamente a ligação entre a superfície nanotopográfica e a adesão bacteriana. Além disso, a maioria superfícies de implantes apresentam nanocaracterísticas irregulares e/ou aleatórias.

Atualmente a estrutura em nanoescala dos implantes médicos/odontológicos não é controlada rigorosamente. Não existe ainda um protocolo padrão definido para a avaliação das características de superfícies irregulares dos implantes, e a sua relação com a adesão bacteriana.

Os implantes dentários geralmente apresentam altas taxas de sucesso á longo prazo so e oferecem cada vez mais possibilidades de tratamento na substituição de dentes perdidos. Os implantes dentários, no entanto, podem falhar(Esposito *et al.*, 1999). Um dos

fatores de risco é periimplantite causada por uma variedade de bactérias, incluindo *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Actinomycetemocomitans A.*, *Fusobacterium nucleatum* e *Bacteroides spp.* (Mombelli 1997).

Para provocar infecção, as bactérias devem primeiro colonizar o local do implante. Na prática, tem sido sugerido que a utilização de um implante com sua superfície apresentando propriedades inibitórias da adesão bacteriana podem contribuir para a redução de perimplantite. O estudo de Pier-Francesco *et al* (2006) avaliou o efeito da modificação físico/química da superfície do titânio sobre a adesão da bactéria *P. gingivalis*. Acredita-se que a aspereza da superfície influencia na colonização microbiana, aumentando a retenção de bactérias dentro das irregularidades da superfície.

Verran & Boyd(2001) propuseram três categorias de rugosidade de superfície, denominando-as como macro, micro e nano-rugosidades (Ra= 0,2 mm). A microrugosidade tem sido sugerida como sendo a superfície apropriada para implantes dentários (Bollen et al.1997) e tem sido postulado é improvável que uma superfície com um Ra abaixo de 0,2mm promova a aderência microbiana devido ao maior tamanho das bactéria.).

A cobertura percentual de *P. Gingivalis* sobre superfícies de titânio é muito mais baixa em superfícies com o Ra de 34nm do que em superfícies com Ra de 155nm, mesmo que esta ainda tenha o Ra menor do que 200nm. Também não houve diferença significativa na porcentagem de cobertura de *P. Gingivalis* entre as amostras de Ra de 155nm e amostras de Ra de 449nm.

É interessante notar que o aumento da rugosidade de superfície acima de 155nm não aumentou a adesão da *P. gingivalis* e poderia ser postulado que o tamanho das irregularidades da superfície era tão grande que não ofereceu maior retenção para as bacterias. Importante, que implantes dentários disponíveis no mercado do tipo Branemark exibiram uma gama de rugosidade de superfície (350 2500 nm). Quirynen et al. (1999)que afirmam que a rugosidade da superfície foi mais importante no acúmulo de placa em torno de um implante do que a energia livre de superfície.

Devido à dificuldade em assegurar uma adequada remoção mecânica de biofilme em torno dos implantes e micro implantes, e a incapacidade antimicrobiana da superfície do titânio, muitos ortodontistas recomendam o uso de bochechos antisséptico no pós-operatório para prevenir infecções. Estes agentes antimicrobianos têm mostrado uma inibição de adesão inicial bacteriana e a subsequente colonização(Chin *et al.*, 2006). O agente mais estudado e mais utilizado na odontologia é a clorexidina. Ela altera a permeabilidade da membrana

celular bacteriana e demonstra substantividade excelente na cavidade oral. O flúor, por outro lado, é o agente mais cariostático conhecido, e os íons de flúor liberados podem afetar o metabolismo, como um inibidor de enzimas. Além disso, vários de complexos metálicos de fluoreto são formados na superfícies de implantes de titânio, tais como  $\text{CuF}_2$ ,  $\text{SnF}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{F}_3$ , e  $\text{TiF}_4$ , influenciando diretamente a adesão bacteriana (Yoshinari *et al.*, 2001).

## 4 CONCLUSÃO

Muitos padrões de superfície foram criados para tentar otimizar a resposta celular dos osteoblastos e inibir a adesão bacteriana. É de suma importância os procedimentos antissépticos durante a cirurgia e logo depois desta para a osseointegração ser obtida. Uma vez que o biofilme bacteriano é formado, as células humanas não conseguem o eliminar e muitas vezes a remoção mecânica deste é impossibilitada.

A rugosidade da superfície influencia diretamente a adesão bacteriana e a resposta celular, porém a relação não é linear, isto é, uma maior rugosidade nem sempre aumenta a adesão bacteriana. Além de influenciar na adesão bacteriana, esta influencia também na absorção, estrutura de proteínas, na estrutura do coágulo e na resposta celular dos osteoblastos.

Modificações na estrutura química da superfície também alteram tais processos. A zircônia parece inibir a adesão bacteriana através de uma SFE menos que a do titânio. Alguns polímeros adicionados á superfície do implante apresentaram resultados interessantes.

A dificuldade em conseguir um perfil ideal da superfície do implante, tanto na topografia quanto na composição química, se deve aos fatores que não existe padronização entre as pesquisas realizadas, tanto na metodologia, quanto na análise dos resultados; a significativa diferença dos resultados *in vivo* e *in vitro* e a diferente resposta á superfície obtida por diferentes espécies de bactérias.

## 5 REFERÊNCIAS

- Absolom D, Zingg W, Neumann A. Protein adsorption to polymer particles: role of surface properties. *Journal Biomedical Material Research* 1987;21:161–71. PMID:3818679.
- Albrektsson T, Albrektsson B. Osseointegration of bone implants. A review of an alternative mode of fixation. *Acta Orthop Scand* 1987;58:567e77.
- Albrektsson T. Direct bone anchorage of dental implants. *J Prothet Dent.* 1983; 50(2): 255-61.
- Albrektsson, T. & Isidor, F. (1994) Consensus report of session IV. In: Lang, N.P. & Karring, T., eds. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*, 365–369. London: Quintessence Publishing Co. Ltd
- An YH, Friedman RJ, Draughn RA, Smith EA, Nicholson JH, John JF. *J Microbiol*
- Anagnostou F, Debet A, Pavon-Djavid G, Goudaby Z, Helary G, Migonney V. Osteoblast functions on functionalized PMMA based polymers exhibiting *Staphylococcus aureus* adhesion inhibition. *Biomaterials* 2006;27:3912e9.
- Bliznakov S, Liu Y, Dimitrov N, Garnica J, Sedev R. *Langmuir* 2009;25:4760.
- Boulangé-Petermann L, Rault J, Bellon-Fontaine M-N. *Biofouling* 1997;11:201.
- Brånemark PI. Osseointegration and its experimental studies. *J Prosthet Dent* 1983;50:399 e 410.
- Cai K, Bossert J, Jandt K. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Colloid Surf B* 2006;49:136e44.
- Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 2006; 27:2331e9.
- Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T, Brånemark PI. Osseointegration of titanium implants. *Acta Orthop Scand* 1986;57: 385–9.
- Carr AB, Beals DW, Larsen PE. Reverse-torque failure of screw-shaped implants in baboons after 6 months of healing. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12:598-603.

- Chin MY, Busscher HJ, Evans R, Noar J, Pratten J. Early biofilm formation and the effects of antimicrobial agents on orthodontic bonding materials in a parallel plate flow chamber. *Eur J Orthod* 2006;28:1–7.
- Chin MYH, Sandham A, Vries J, Mei HC, Busscher JH. Biofilm formation on surfacecharacterized micro-implants for skeletal anchorage in orthodontics. *Science direct*, 2007, 2032-2040.
- Chua PH, Neoh KG, Kang ET, Wang W. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials* 2008;29:1412e21.
- Chung KK, Schumacher JF, Sampson EM, Burne RA, Antonelli PJ, Brennan AB. *Biointerphases* 2007;2:89.
- Colon G, Ward BC, Webster TJ. Increased osteoblast and decreased *Staphylococcus epidermidis* functions on nanophase ZnO and TiO<sub>2</sub>. *J Biomed Mater Res* 2006;78A:595e604.
- Crawford RJ, Hayden KW, Khanh T, Jafar H, Elena PI. *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier J 2012; 179-182. 142-149.
- Crick CR, Ismail S, Pratten J, Parkin IP. *Thin Solid Films* 2011;519:3722.
- Dalsin JL, Lin L, Tosatti S, Vörös J, Textor M, Messersmith PB. Protein resistance of titanium oxide surfaces modified by biologically inspired mPEGDOPA. *Langmuir* 2005;21:640e6.
- Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:114e22.
- De Jonge LT, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Jansen JA. Organiceinorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharm Res* 2008;25: 2357e69.
- Del Curto B, Brunella MF, Giordano C, Pedferri MP, Valtulina V, Visai L, et al. Decreased bacterial adhesion to surface-treated titanium. *Int J Artif Organs* 2005;28:718e30.
- Díaz C, Salvarezza RC, Fernández Lorenzo de Mele MA, Schilardi PL. *ACS Appl*

- Fadeeva E, Truong VK, Stiesch M, Chichkov BN, Crawford RJ, Wang J, et al. *Langmuir* 2011;27:3012.
- Flint SH, Brooks JD, Bremer PJ. Properties of the stainless steel substrate influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *J Food Eng* 2000; 43:235e42.
- Fröjd V, Chávez de Paz L, Andersson M, Wennerberg A, Davies JR, Svensäter G. *Mol Oral Microbiol* 2011;26:241.
- Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987;237:1588e95.
- Hall J, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjö UME. Bone formation at rhBMP-2-coated titanium implants in the rat ectopic model. *J Clin Periodontol* 2007; 34:444e51.
- Hamilton V, Yuan YL, Rigney DA, Chesnutt BM, Puckett AD, Ong JL, et al. Bone cell attachment and growth on well-characterized chitosan films. *Polym Int* 2007;56:641e7.
- Hanawa T, Kamiura Y, Yamamoto S, Kohgo T, Amemiya A, Ukai H, et al. Early bone formation around calcium-ion implanted titanium inserted into rat tibia. *J Biomed Mater Res* 1997;36:131e6.
- Harris LG, Richards RG. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:311.
- Harris LG, Tosatti S, Wieland M, Textor M, Richards RG. Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials* 2004;25:4135e48.
- Harris LG, Tosatti S, Wieland M, Textor M, Richards RG. Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials* 2004;25:4135e48.
- Harwood PJ, Giannoudis PV. Application of bone morphogenetic proteins in orthopedic practice: their efficacy and side effects. *Expert Opin Drug Saf* 2005;4:75e89.
- Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Antimicrobial treatment of periimplant diseases. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(Suppl): 128–39.

- Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, Schumacher-Perdreau F, et al. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* 1988;158:693e701.
- Hetrick EM, Schoenfisch MH. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem Soc Rev* 2006;35:780e9.
- Hilbert LR, Bagge-Ravn D, Kold J, Gram L. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *Int Biodeter Biodegr* 2003;52:175e85.
- Hochbaum AI, Aizenberg J. *Nano Lett* 2010;10:3717.
- Kanomi R. Mini-implant for orthodontic anchorage. *J Clin Orthod* 1997;31:763–7.
- Kerner S, Migonney V, Pavon-Djavid G, Helary G, Sedel L, Anagnostou F. Bone tissue response to titanium implant surfaces modified with carboxylate and sulfonate groups. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:707e15.
- Kieswetter, K et al, Surface roughness modulates the local production of growth factors and Citokines by osteoblast like Mg 63 cels. *J biomedical Res*, V32, p55,63, 1996.
- Langhoff J, Voelter K, Scharnweber D, Schnabelrauch M, Schlottig F, Hefti T, et al. Comparison of chemically and pharmaceutically modified titanium and zirconia implant surfaces in dentistry: a study in sheep. *International Journal Oral Maxillofacial Surgery* 2008;37:1125–32.
- Le Guéhenec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. *Dent Mater* 2007;23:844.
- Lee JH, Wang H, Kaplan JB, Lee WY. Effects of *Staphylococcus epidermidis* on osteoblast cell adhesion and viability on a Ti alloy surface in a microfluidic co-culture environment. *Acta Biomater* 2010;6:4422e9.
- Li RH, Wozney JM. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol* 2001;19:255e65.
- Lim JY, Hansen JC, Siedlecki CA, Runt J, Donahue HJ. Human foetal osteoblastic cell response to polymer-demixed nanotopographic interfaces. *J R Soc Interface* 2005;2:97e108.

- Lima EMCX, Koo H, Vacca-Smith AM, Rosalen PL, Del Bel Cury AA. Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Clinical Oral Implants Research* 2008;19:780–5.
- Liu X, Chu PK, Ding C. *Mat Sci Eng R* 2004;47:49.
- Lord MS, Foss M, Besenbacher F. Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response. *Nano Today* 2010;5:66e78.
- Ma J, Sun Y, Gleichauf K, Lou J, Li Q. *Langmuir* 2011;27:10035.
- Maddikeri RR, Tosatti S, Schuler M, Chessari S, Textor M, Richards RG, et al. Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces. *J Biomed Mater Res* 2008;84A:425e35.
- Manicone PF, Lommetti PR, Raffaelli L. An overview of zirconia ceramics: basic properties and clinical applications. *Journal of Dentistry* 2007;35:819–26.
- Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995;29:389e401.
- *Mater Interfaces* 2010;2:2530.
- *Methods* 1995;24:29.
- Mitik-Dineva N, Wang J, Truong VK, Stoddart P, Malherbe F, Crawford RJ, et al. *Curr Microbiol* 2009;58:268.
- Mitik-Dineva N, Wang J, Truong VK, Stoddart PR, Alexander MR, Albutt DJ, et al. *Biofouling* 2010;26:461.
- Mitik-Dineva N, Wang J, Truong VK, Stoddart PR, Malherbe F, Crawford RJ, et al. *Biofouling* 2009;25:621.
- Moriarty TF, Schlegel U, Perren S, Richards RG. Infection in fracture fixation: can we influence infection rates through implant design? *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:1031e5.

- Morra M. Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins. *Eur Cell Mater* 2006;12:1e15.
- Nejadnik MR, van der Mei HC, Norde W, Busscher HJ. Bacterial adhesion and growth on a polymer brush-coating. *Biomaterials* 2008;29:4117e21.
- Neoh KG, Xuefeng H, Zheng D, Kang ET. Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces *Biomaterials* 33 (2012) 2813e2822
- Pier-Francesco A, Adams RJ, Waters MGJ, Williams DW. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. *Clin. Oral Impl. Res.* 17, 2006; 633–637 doi: 10.1111/j.1600-0501.2006.01274.
- Pitt WG, Morris RN, Mason ML, Hall MW, Luo Y, Prestwich GD. Attachment of hyaluronan to metallic surfaces. *J Biomed Mater Res* 2004;68A:95e106.
- Ploux L, Ponche A, Anselme K. Bacteria/material interfaces: role of the material and cell wall properties. *J Adhes Sci Technol* 2010;24:2165e201.
- Poelstra KA, Barekzi NA, Rediske AM, Felts AG, Slunt JB, Grainger DW. Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies. *J Biomed Mater Res* 2002;60:206e15.
- Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials* 2010;31:706e13.
- Puleo DA, Kissling RA, Sheu MS. A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials* 2002;23:2079e87.
- Quirynen M, Bollen C. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *Journal of clinical Periodontology* 1995;22:1–14.
- Quirynen M, Van der Mei H, Bollen C, Schotte A, Marechal M, Doornbusch G, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the

- microbiology of supra and subgingival plaque. *Journal of Dental Research* 1993;72:1304–2130.
- Raafat D, von Bargaen K, Haas A, Sahl HG. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl Environ Microb* 2008;74: 3764e73.
  - Radha ASD, Dymock D, Younes C, Sullivan DO, Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *Journal of dentistry* 40 (2012) 146–153
  - Rechendorff K, HovgaardMB, FossM, Zhdanov VP, Besenbacher F. Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir*2006;22:10885e8.
  - Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *International Journal Oral Maxillofacial Surgery* 2002;17:793–8.
  - Rosales-Leal JI, Rodríguez-Valverde MA, Mazzagliaa G, Ramón-Torregrosa PJ, Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, et al. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloid Surf A* 2010;365:222e9.
  - Rosales-Leal JI, Rodríguez-Valverde MA, Mazzagliaa G, Ramón-Torregrosa PJ, Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, et al. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloid Surf A* 2010;365:222e9.
  - Rowan B, Wheeler MA, Crooks RM. *Langmuir* 2002;18:9914.
  - Rozhok S, Fan Z, Nyamjav D, Liu C, Mirkin CA, Holz RC. *Langmuir* 2006;22:11251. Hou S, Gu H, Smith C, Ren D. *Langmuir* 2011;27:2686.
  - Rudney J. Saliva and dental plaque. *Advance Dental Research* 2000;14:29–39.
  - Sardin S, Morrier J, Benay G, Barsotti O. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. *Journal of Oral Rehabilitation* 2004; 31:140–8.
  - Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero G, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *Journal Periodontology* 2004;75:292–6.

- Schachter B. Slimy business e the biotechnology of biofilms. *Nat Biotech* 2003;21:361e5.
- Schroeder A, Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with sprayed-titanium surfaces. *J Maxillofac Surg* 1981;9:15-25.
- Shi ZL, Neoh KG, Kang ET, Poh CK, Wang W. Surface functionalization of titanium with carboxymethyl chitosan and immobilized bone morphogenetic protein-2 for enhanced osseointegration. *Biomacromolecules* 2009;10: 1603e11.
- Shi ZL, Neoh KG, Kang ET, Poh CK, Wang W. Titanium with surface-grafted dextran and immobilized bone morphogenetic protein-2 for inhibition of bacterial adhesion and enhancement of osteoblast functions. *Tissue Eng Part A* 2009;15:417e26.
- Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, et al. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* 2000;68: 6871e8.
- Somayaji SN, Huet YM, Gruber HE, Hudson MC. UV-killed *Staphylococcus aureus* enhances adhesion and differentiation of osteoblasts on boneassociated biomaterials. *J Biomed Mater Res* 2010;95A:574e9.
- Sousa SR, Lamghari M, Sampaio P, Moradas-Ferreira P, Barbosa MA. Osteoblast adhesion and morphology on TiO<sub>2</sub> depends on the competitive preadsorption of albumin and fibronectin. *J Biomed Mater Res* 2008;84A:281e90.
- Subbiahdoss G, Kuijjer R, Grijpma DW, van der Mei HC, Busscher HJ. Microbial biofilm growth vs. tissue integration: “The race for the surface” experimentally studied. *Acta Biomater* 2009;5:1399e404.
- Subbiahdoss G, Pidhatika B, Coullerez G, Charnley M, Kuijjer R, van der Mei HC, et al. Bacterial biofilm formation versus mammalian cell growth on titaniumbased mono- and bi-functional coatings. *Eur Cells Mater* 2010;19:205e13.
- Suttler F, Schroeder A, Buser D. The new concept of ITI hollow-cylinder and hollow-screw implants. 1. Engineering and design. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988;3:161-172.

- Sycaras, N et al. Implant materials designs and surface topographies. Their effect on osseointegration. *Int J Oral Maxillofac implants*. V15, N5 p675-690, 2000.
- Trampuz A, Osmon D, Hanssen A, Steckelberg JM, Patel R. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin Orthop Relat Res* 2003;414:69e88.
- Truong VK, Lapovok R, Estrin Y, Rundell S, Wang JY, Fluke CJ, et al. *Biomaterials* 2010;31:3674.
- Vester H, Wildemann B, Schmidmaier G, Stöckle U, Lucke M. Gentamycin delivered from a PDLA coating of metallic implants In vivo and in vitro characterisation for local prophylaxis of implant-related osteomyelitis. *Injury Int J Care Injured* 2010;41:1053e9.
- Wakabayashi H, Yamauchi K, Kobayashi T, Yaeshima T, Iwatsuki K, Yoshie H. Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009;53:3308–16.
- Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009;20: 172e84.
- Wenz H, Bartsch J, Wolfart S, Kern M. Osseointegration and clinical success of zirconia dental implants: a systematic review. *International Journal Prosthodontics* 2008;21:27–36.
- Whitehead KA, Colligon J, Verran J. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;41:129.
- Whitehead KA, Colligon J, Verran J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloid Surf B* 2005;41:129e38.
- Whitehead KA, Colligon J, Verran J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloid Surf B* 2005;41:129e38.
- Wiemann M, Jennissen H, Rumpf H, Winkler L, Chatzinikolaidou M, Schmitz I, et al. A reporter-cell assay for the detection of BMP-2 immobilized on porous and nonporous materials. *J Biomed Mater Res* 2002;62:119e27

- Winkler L, Bingmann D, Wiemann M. Heat treatment of BMP-2 depots on implant materials generates an immobilized layer of BMP-2 with pronounced bioactivity. *J Biomed Mater Res* 2006;79A:895e901.
- Wu Y, Zitelli JP, TenHuisen KS, Yu X, Libera MR. Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. *Biomaterials* 2011;32:951e60.
- Yang JY, Ting YC, Lai JY, Liu HL, Fang HW, Tsai WB. Quantitative analysis of osteoblast-like cells (MG63) morphology on nanogrooved substrata with various groove and ridge dimensions. *J Biomed Mater Res* 2009;90A:629e40.
- Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K, Hirayama A. Influence of surface modifications to titanium on oral bacterial adhesion in vitro. *J Biomed Mater Res* 2000;52:388e94.
- Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. *Biomaterials* 2001;22:2043–8.
- Zhang F, Zhang ZB, Zhu XL, Kang ET, Neoh KG. Silk-functionalized titanium surfaces for enhancing osteoblast functions and reducing bacterial adhesion. *Biomaterials* 2008;29:4751e9.
- Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis* 1982;146(4):487e97.