



CEPPE

Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

MESTRADO EM ODONTOLOGIA

RENAN DALLA SOARES

**ANÁLISE *IN VITRO* DA ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE
OSTEOBLASTOS SOBRE A SUPERFÍCIE DE ZIRCÔNIA
TRATADA POR LASER DE Er,Cr:YSGG (*ERBIUM-
CHROMIUM: YTTRIUM, SCANDIUM, GALLIUM , GARNET*)**

Guarulhos

2012

RENAN DALLA SOARES

**ANÁLISE *IN VITRO* DA ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE
OSTEOBLASTOS SOBRE A SUPERFÍCIE DA ZIRCÔNIA
TRATADA POR LASER DE Er,Cr:YSGG (*ERBIUM-
CHROMIUM: YTTRIUM, SCANDIUM, GALLIUM , GARNET*)**

Dissertação apresentada à Universidade
Guarulhos para obtenção do título de Mestre
em Odontologia.

Área de Concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. José Augusto Rodrigues

Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Cassoni

Guarulhos


2012

FICHA CATALOGRÁFICA

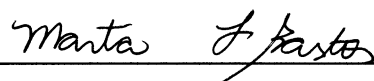
S676a	<p>SOARES, Renan <u>Dalla</u>. Análise <i>in vitro</i> da adesão e proliferação de osteoblastos sobre a superfície de zircônia tratada por laser de er,cr:ysgg (<i>erbium chromium: yttrium, scandium, gallium, garnet</i>) / Renan <u>Dalla</u> Soares. Guarulhos, 2012. 42 f. : il. ; 31 cm</p> <p>Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Centro de pós-graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, 2012. Orientador: Prof. Dr. José Augusto Rodrigues Bibliografia: 42 f.</p> <p>1. Laser de Er, 2. Cr:YSGG, 3. osteoblastos, 4. zircônia. 5. <u>tratamento</u> de superfície 6. implantes dentários 7. cultura de células I. Título. II. Universidade Guarulhos.</p> <p style="text-align: right;">CDD 22^ª 617.6</p>
-------	--

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada “ANÁLISE IN VITRO DA ADESÃO DE OSTEOBLASTOS SOBRE A SUPERFÍCIE DA ZIRCÔNICA MODIFICADA POR LASER DE Er,CR:YSGG (ERBIUM-CHROMIUM: YTTRIUM, SCANDIUM, GALLIUM, GARNET)” em sessão pública realizada em 29 de Fevereiro de 2012, considerou o candidato RENAN DALLA SOARES aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Prof. Dr. José Augusto Rodrigues (UnG) 

2. Profa. Dra. Maria Christina Brunetti (SENAC) 

3. Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos (UnG) 

Guarulhos, 29 de Fevereiro de 2012.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa **Danielle** e às minhas filhas **Estella** e **Alice**, amores da minha vida, que me dão força e coragem para prosseguir.

Dedico este trabalho ao meu pai **Sebastião Tamburini Soares** (*in memoriam*), a minha mãe **Iara Dalla Soares** e aos meus irmãos **Denis, Luciana** e **Allan** que me acompanham por toda a vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Augusto Rodrigues, que me deu a honra de tê-lo como orientador, pela amizade e paciência, cuja dedicação o faz um exemplo de profissional.

À Profa. Dra. Alessandra Cassoni Ferreira que, com entusiasmo, sempre acreditou no sucesso do trabalho.

Ao Prof. Dr. Jamil Awad Shibli, por ter me recebido como aluno no curso de mestrado e compartilhado comigo seus conhecimentos, ideias e filosofias. Muito obrigado.

À Profa. Dra. Marta Bastos, pela sua inestimável ajuda científica e metodológica, que permitiu um melhor desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado.

A todos os professores do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Guarulhos, pela amizade e pelo estímulo na busca pelo conhecimento.

À Profa. Dra. Maria Christina Brunetti, um exemplo de pessoa e uma profissional admirável, que por todos estes anos confia em mim, nesta parceria pela docência em Periodontia e me honra com sua inestimável amizade. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Paulo Francisco Cesar, da Universidade de São Paulo, pela amizade e por disponibilizar a zircônia para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Alberto Blay, por ter me recebido tão bem em sua clínica e pelo suporte no uso do laser de Er,Cr:YSGG.

À Profa. Dra. Ariadne Cruz e à Profa. Dra. Claudia O. Simões, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo total suporte técnico e científico na realização da cultura dos osteoblastos.

Aos colegas de mestrado, Alexandre Dottore, Fabiano Zanardo, José Della Pasqua Neto, Karen Bechara, Pérsio Vasconcelos e Ricardo Vecchiatti, e do doutorado, Carlos Eduardo Pena, José Divino, Luis Braga e Ronaldo Viotti, pelo companheirismo e amizade.

À equipe de Periodontia do Senac-SP, Profa. Cristiane Prazeres, Profa.

Renata Morceli Campos e Profa. Dra. Teresa Morais, pela amizade e pela luta na realização de um excelente curso de Especialização em Periodontia.

A todos os funcionários do Senac-SP, em especial os diretores clínicos Prof. Dr. Flávio Zoega e Profa. Dra. Lílian Cabral, pelo carinho e compreensão nos momentos em que me ausentei para me dedicar ao Mestrado e, também, pela ajuda com a infra estrutura do Centro Universitário Senac-SP.

À Universidade Guarulhos, pela oportunidade dada na obtenção do título de Mestre.

Aos funcionários do Curso de Odontologia da Universidade Guarulhos pela dedicação e apoio.

A toda minha família, em especial minha esposa Danielle, minha filhinha Estella e minha mãe Iara, pela compreensão nos momentos que não estive presente. Muito obrigado.

RESUMO

Em função da inerente resistência, biocompatibilidade e cor semelhante ao dente, a zircônia tem potencial para tornar-se uma alternativa como material para implantes dentários. O objetivo do presente estudo foi investigar a adesão e proliferação de osteoblastos sobre a superfície da zircônia tetragonal policristal estabilizada por ítrium (Y-TZP) irradiada por laser de Er,Cr:YSGG. Quarenta e oito blocos de zircônia Y-TZP (Vita In-Cenam YZ) com dimensões de 5x5x2mm foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos para a irradiação com laser: G1= controle (sem irradiação); G2= 1,5W; G3= 3,0W; G4= 5,0W. Cada bloco foi tratado por 30s com laser de Er,Cr:YSGG (Waterlase, Biolase Technologies Inc), em modo focado, com taxa de repetição de 20Hz, com refrigeração de água e ar. As amostras foram limpas em cuba ultrassônica por 10 min em solução de acetona, álcool etílico e água destilada, e foram esterilizadas em autoclave por 20 min, a 121°C sob 2 ATM. Doze blocos de cada grupo foram inseridos em uma placa de 96 poços. Células osteoblásticas do tipo MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC, Manassas, VA, USA) foram cultivadas em meio de cultura MEM α -modificado. As células foram tripsinizadas e semeadas na concentração de 1×10^4 cels/ml. O meio de cultura foi trocado após o primeiro dia. Ao terceiro e sétimo dia, a proliferação celular foi mensurada pelo método colorimétrico de avaliação 3-[4,5- dimethylthiazol-2yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT test, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As células foram fixadas em glutaraldeído e preparadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação da adesão e morfologia celulares. Após três dias de incubação, a avaliação pelo método MTT mostrou que as células MC3T3-E1 aderiram e se proliferaram em todos os grupos. Comparado ao G1 (controle), no G2 houve uma proliferação 1,4% maior ($p > 0,05$), no G3 houve uma proliferação 3,1% maior ($p < 0,05$) e no G4 houve uma proliferação 4,5% maior ($p < 0,01$) (ANOVA, Newman-Keuls). Após 7 dias de incubação, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, Newman-Keuls). As imagens obtidas nas análises do MEV demonstraram que, em todas as amostras, os osteoblastos MC3T3-E1 aderiram e se proliferaram. Portanto, a irradiação com laser de Er,Cr:YSGG pode ter contribuído para uma maior proliferação celular sobre as superfícies de Y-TZP. No entanto, após sete dias, a proliferação celular foi similar.

Palavras-Chave: Laser de Er,Cr:YSGG; osteoblastos; zircônia; tratamento de superfície; implantes dentários; cultura de células.

ABSTRACT

Because of its inherent strength, biocompatibility, and tooth-like color, zirconia ceramics have the potential to become an alternative to titanium as dental implant material. The aim of the present study was investigate the adhesion and proliferation of osteoblasts on yttrium-stabilized tetragonal zirconia polycrystal (Y-TZP) surface after Er,Cr:YSGG laser irradiation treatment. Forty-eight blocks of zirconia Y-TZP (Vita In-Ceram YZ) with 5x5x2mm were randomized in four groups to laser irradiation: G1= control (no laser irradiation); G2= 1.5W; G3= 3.0W; G4= 5.0W. Each block was treated for 30s with Er,Cr:YSGG laser (Waterlase, Biolase Technologies Inc), in focused mode, repetition rate fixed on 20 Hz, with air-water irrigation. The specimens were ultrasonically cleaned for 10 min in acetone, ethyl alcohol, and distilled water, and were sterilized for 20 min at 121°C under 2 ATM. Twelve blocks of each group were inserted in a 96-well plate. Osteoblast cells MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in α -Modified Minimal Essential medium, and when reached confluence they were trypsinated and seeded onto the treated surfaces at a plate density of 1×10^4 cells/ml. The media were exchanged after 1-day. At the third and seventh day, cell proliferation was measured by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT test, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) colorimetric assay methods. Cells were fixed with glutaraldehyde and prepared to scanning electron microscope (SEM) to observe adhesion and morphology. After three days of incubation the MTT assay showed adhesion and proliferation of MC3T3-E1 cells in all groups. Compared to Group-1 (control), the Group-2 had a proliferation 1.4% higher ($p > 0.05$), the Group-3 had a proliferation 3.1% higher ($p < 0.05$) and Group-4 had a proliferation 4.5% higher ($p < 0.01$). After seven days there was no difference between the groups (ANOVA, Newman-Keuls). SEM images demonstrated that MC3T3-E1 on all the plates appeared to attach and spread well. Er,Cr:YSGG laser irradiation may have contributed to the greater and earlier cell spreading that was observed with the Y-TZP surface, however after seven days cell proliferation were similar in both surface.

Key words: Er,Cr:YSGG laser; osteoblasts; zircônia; surface treatment; dental implants; cell culture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	9
1.1. OSSEOINTEGRAÇÃO DOS IMPLANTES DENTÁRIOS.....	9
1.2. USO DA ZIRCÔNIA COMO BIOMATERIAL.....	11
1.3. TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DA ZIRCÔNIA E O USO DO LASER DE ALTA POTÊNCIA.....	13
1.4 ADESÃO CELULAR À SUPERFÍCIE DE IMPLANTES: ESTUDOS IN VITRO	16
2. PROPOSIÇÃO	19
3. DESENVOLVIMENTO.....	20
<i>IN VITRO</i> BEHAVIOR OF OSTEOBLASTS ON ZIRCONIA AFTER ER,Cr:YSGG-LASER IRRADIATION.....	21
4. CONCLUSÕES	35
5. REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A reposição de dentes perdidos por implantes de titânio em pacientes parcial ou completamente edêntulos, tem se tornado uma modalidade de terapia restauradora bem documentada e aceita cientificamente (Steinemann, 1998; Albrektsson et al., 2008).

Os implantes têm demonstrado uma alta taxa de sucesso, de aproximadamente 98% em mandíbula e 95% em maxila após um período superior a 10 anos (Esposito et al., 1998). Esse sucesso é devido a obtenção de uma adequada e estável integração do implante de titânio ao tecido ósseo. A osseointegração é a conexão direta (estrutural e funcional) entre o osso neoformado e a superfície do implante, sobre a ação de carga funcional, sem a interposição de tecido fibroso (Albrektsson et al., 1981).

1.1. OSSEOINTEGRAÇÃO DOS IMPLANTES DENTÁRIOS

Em 1981, Albrektsson e colaboradores descreveram seis fatores que podem influenciar na osseointegração: a qualidade óssea, a técnica cirúrgica, as condições da instalação do implante, o material do implante, o desenho do implante, e as propriedades da superfície do implante (Albrektsson et al., 1981).

A quantidade e a qualidade óssea são dois fatores primordiais que determinarão o nível de conexão entre implante e tecido ósseo. De fato, volume e densidade óssea suficientes são os fatores-chave para o sucesso do tratamento com implantes dentários (Esposito et al., 1998). No entanto, em diversas situações, as condições ósseas não se encontram favoráveis e modificações de técnicas cirúrgicas, melhorias na composição do material de confecção e modificações no desenho macro e microscópico dos implantes, podem ajudar na estabilidade e na longevidade dos tratamentos (Marković et al., 2011).

Diversos autores têm estudado os fatores relacionados às propriedades das superfícies, como rugosidade, topografia e composição química (Keselowsky et al., 2004; Conserva et al., 2010; Magnani et al., 2003). Da mesma forma, tem se desenvolvido diversos métodos capazes de alterar tais características das superfícies dos implantes com o objetivo de, não apenas aumentar o contato

ossoimplante, como também de diminuir o tempo em que este íntimo contato ocorre (Shibli et al., 2010; Shibli et al., 2007; Ferguson et al., 2006; Shalabi et al., 2006).

A sensibilidade do citoesqueleto dos osteoblastos em se organizar de acordo com a estrutura da superfície parece ser alta quando apresenta um nível intermediário de rugosidade, e baixa em relação às superfícies lisas ou extremamente rugosas (Lange et al., 2002).

No entanto, a morfologia ideal da superfície dos implantes ainda é desconhecida (Butz et al., 2011). As propriedades topográficas das superfícies dos implantes têm demonstrado um papel fundamental no comportamento celular. Diversos biomateriais e métodos de modificação de superfície têm sido introduzidos para melhorar os níveis de contato ossoimplante e reduzir o tempo de cicatrização no processo de osseointegração (Ko et al., 2007). Utilizam-se técnicas por adição ou subtração para alterar a topografia das superfícies dos implantes, como oxidação, jateamento de partículas, condicionamento com ácidos ou a combinação dessas técnicas (Sykaras et al., 2000), e preparadas por laser (Wong et al., 1995; Shibli et al., 2010-b).

O objetivo destas alterações nas superfícies dos implantes é de promover uma osteogênese peri-implantar superior quando comparada a aquela que ocorre ao redor de implantes com superfícies convencionais, conhecidas por lisas (Wennerberg e Albrektsson, 2009). Atualmente, está bem esclarecido que microrrugosidades na superfície do titânio promovem a retenção das fibrinas do coágulo sanguíneo, o qual permite a migração de células osteogênicas para a superfície do implante, promovendo uma mais rápida produção da matriz extracelular e sua mineralização pelos osteoblastos (Zhu et al., 2004).

Além disso, implantes com superfícies microrrugosas apresentam uma maior porcentagem de contato ossoimplante e clinicamente requerem maiores forças de contra torque para quebrar a ancoragem, quando comparados a implantes de superfície lisa (Shalabi et al., 2006).

Associada à rugosidade da superfície dos implantes, a hidrofília, ou seja, a maior afinidade por líquidos, também tem um forte efeito no comportamento das células, pois promove uma maior e mais rápida interação do coágulo sanguíneo com os biomateriais favorecendo a adesão e proliferação celular (Ferguson et al., 2006; Hao et al., 2004).

1.2. USO DA ZIRCÔNIA COMO BIOMATERIAL

Os implantes dentários e pilares protéticos são usualmente fabricados em titânio comercialmente puro, principalmente devido sua bem documentada biocompatibilidade e suas propriedades mecânicas (Albrektsson et al., 2008).

Todavia, a principal desvantagem do uso do titânio como um biomaterial é sua cor cinza escuro que pode transparecer na peça protética. Desta forma, condições desfavoráveis de tecido mole ou retrações da mucosa peri-implantar, podem levar a um problema estético gengival, especialmente quando dentes superiores e anteriores estão envolvidos (Heydecke et al., 1999; Kohal et al., 2006).

Bressan e colaboradores (2011), avaliaram a influência do material do pilar protético sobre a cor da mucosa peri-implantar em restaurações implanto suportadas. Compararam os materiais titânio, zircônia e ouro, e verificaram que o pilar de titânio modificou a cor da mucosa peri-implantar, significativamente, mais do que os outros materiais estudados (Bressan et al., 2011).

Um dos maiores objetivos da implantologia moderna é o aprimoramento de técnicas e dispositivos, para que esses se integrem de forma rápida e eficiente ao tecido ósseo, agregando função e estética ao tratamento reabilitador (Depprich et al., 2008; Puleo e Thomas, 2006).

Nesse contexto, a utilização da zircônia tetragonal estabilizada por ítrio (Y-TZP) ou da zircônia parcialmente estabilizada por ítrio (Y-PSZ) vêm se tornando cada vez mais popular na área da implantologia, principalmente devido à sua boa biocompatibilidade e resultados estéticos favoráveis (Kohal et al., 2006). Sua cor é similar à cor de um dente natural e, portanto, extremamente útil em regiões anteriores, em que a obtenção de estética é crítica (Ahmad et al., 1998).

Em um estudo clínico de quatro anos, a zircônia demonstrou estabilidade como pilar protético de coroas unitárias em pré molares e dentes anteriores, com uma reação extremamente favorável dos tecidos peri-implantares moles e duros (Glauser et al., 2004). Em implantes de zircônia de corpo único foi notada uma boa resposta dos tecidos moles, semelhante à encontrada nos implantes de titânio (Kohal et al., 2004; Kohal et al., 2008).

Outra vantagem da zircônia é a baixa formação de biofilme, a qual reduz o risco de processos inflamatórios e alterações nos tecidos moles adjacentes (Akagawa et al., 1998).

Além da estética e biocompatibilidade, as propriedades mecânicas da zircônia, incluindo alta resistência flexural (900 a 1.200 MPa), alta dureza (1.200 Vickers) e adequado módulo Weibull (10 a 12) fazem desta, um material ainda mais interessante que o titânio para ser utilizado como implante osseointegrável (Piconi et al., 1998; Bachle et al., 2007).

A zircônia é radiopaca e claramente visível em radiografias (Ahmad et al., 1998). Além disso, possui uma característica de autoproteção, pois quando submetida ao estresse e conseqüente formação de trinca, a transformação local da fase tetragonal para a fase monoclinica resulta em uma expansão volumétrica local contendo a propagação da trinca. A transformação absorve parte da energia necessária para a propagação da trinca, ocorrendo um aumento da tenacidade à fratura. (Hisbergues et al., 2009). Estudos clínicos com pilares protéticos em zircônia mostraram que, em períodos de 4 e 6 anos de observação, estes pilares obtiveram índice de sucesso de 100% (Glauser et al., 2004; Glauser et al., 2004-b).

Apesar destes benefícios, a zircônia apresenta algumas limitações. Sob condições de carregamento cíclico, principalmente na cavidade oral, ocorre a fadiga hidrolítica relacionada ao tempo e incidência de trincas (Tinschert et al., 2007). Em particular, as mudanças de fases microestruturais que ocorrem quando a zircônia é submetida ao estresse, podem reduzir o tempo de vida das restaurações dentárias (Tinschert et al., 2007). Além disso, relatos de casos, como o recente estudo de Osman e colaboradores (2012), mostrou que implantes de zircônia podem fraturar durante a instalação em regiões de maior densidade óssea. Estes autores concluíram que os implantes de zircônia devem ter características de design específicas e passar por rígido controle de qualidade durante sua manufatura, e teorizam que modificações nas técnicas e no protocolo cirúrgico podem ser necessárias (Osman et al., 2012). Já o trabalho de Gahlert e colaboradores (2011), avaliou 13 implantes de zircônia de corpo único (Z-Look3) fraturados, de um total de 170 implantes inseridos e sob carregamento, por um período de $36,75 \pm 5,34$ meses. Dos 13 implantes fraturados, 12 tinham diâmetro de 3,25 mm e um tinha diâmetro de 4 mm. Todos os implantes fraturados estavam localizados na região anterior da

maxila ou mandíbula. Os autores concluíram que implantes de zircônia de diâmetro reduzido (3,25 mm) não podem ser recomendados para uso clínico e, melhorias do material cerâmico, assim como, modificações no desenho geométrico do implante devem ser providenciadas, para reduzir as taxas de fraturas (Gahlert et al., 2012).

Estudos com modelos animais mostraram resultados promissores para a osseointegração de implantes de zircônia sobre condições de carregamento e cargas oclusais ou não, em oito mandíbulas (Akagawa et al., 1998) e seis maxilas de macacos (Kohal et al., 2004), e nenhuma perda de implante foi relatada.

Por meio de uma revisão sistemática, Andreiotelli e colaboradores (2009) encontraram apenas três estudos clínicos retrospectivos de 1 a 1,8 anos, utilizando implantes de zircônia em humanos, nos quais somente as taxas de sobrevivência de 84 a 98% destes implantes foram relatadas. Esses autores questionaram a qualidade da osseointegração e consideraram que o suporte científico para o uso destes implantes, em humanos, ainda é muito pobre (Andreiotelli et al., 2009). Um destes estudos clínicos foi o de Oliva e colaboradores (2007), apresentando uma taxa de sucesso de 98% de 100 implantes instalados em 36 pacientes, pelo período de um ano de acompanhamento (Oliva et al., 2007).

Em outro estudo, Oliva e colaboradores (2010) demonstraram taxas de sucesso de 95% em cinco anos de acompanhamento clínico de 831 implantes de zircônia realizados em 378 pacientes, o que indica que a reposição de dentes com esse tipo de implante é uma alternativa viável (Oliva et al., 2010).

1.3. TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DA ZIRCÔNIA E O USO DO LASER DE ALTA POTÊNCIA

Da mesma forma que os implantes de titânio podem ter a osseointegração melhorada quando sua superfície é tratada, em modelos animais os implantes de zircônia com diferentes tipos de modificação de superfície têm mostrado um padrão cicatricial com um forte contato entre o tecido ósseo e implante após a inserção (Akagawa et al., 1998; Kohal et al., 2004; Sennerby et al., 2005; Gahlert et al., 2009).

Em recente estudo, foi demonstrado que após 8 e 12 semanas da instalação, os implantes de zircônia de superfície lisa apresentaram um valor de torque de remoção (RTV) estatisticamente menor que implantes jateados por óxido de

zircônia, e menor que implantes de titânio jateados com óxido de zircônia e condicionados com ácido (Gahlert et al., 2009).

Implantes de zircônia de corpo único, com três diferentes tratamentos de superfície foram desenvolvidos para o estudo de Oliva e colaboradores (2010), e estes implantes apresentaram taxa de sucesso de 95% em 5 anos (Oliva et al., 2010).

Em estudos *in vitro*, têm sido demonstrado que o tratamento da superfície da zircônia por ablação a laser de alta potência pode promover alterações na microestrutura, produzir controlada rugosidade e melhorar as características hidrofílicas da zircônia o que, subsequentemente, melhora a adesão, diferenciação e proliferação dos osteoblastos e fibroblastos humanos (Hao et al., 2004; Hao e Laurence, 2004).

Hao e colaboradores, em 2004, utilizaram o laser de dióxido de carbono (CO₂) e promoveram alterações na superfície de uma zircônia parcialmente estabilizada por magnésio (MgO-PSZ). As superfícies tratadas e não tratadas foram comparadas e concluiu-se que o laser de CO₂ aumenta a rugosidade da superfície, a presença de oxigênio (O₂) e a energia de superfície, gerando um aumento nas características de molhabilidade da MgO-PSZ e um aumento na adesão de osteoblastos (Hao et al., 2004).

Um estudo realizado por Stübinger e colaboradores (2008) comparou os efeitos do laser de *Erbium: Yttrium, Aluminium, Garnet* (Er:YAG), do laser de CO₂ e do laser de diodo sobre a superfície de discos de Y-TZP. Em diferentes intensidades o laser de CO₂ produziu efeitos indesejáveis nas superfícies como microfraturas e derretimento do material. Por outro lado o laser de Er:YAG e o laser de diodo não foram capazes de promover qualquer alteração na superfície da zircônia (Stübinger et al., 2008).

O laser de *neodymium: yttrium, aluminium, garnet* (Nd:YAG) também foi utilizado em diferentes intensidades sobre a superfície de MgO-PSZ (Hao e Lawrence, 2006) e sobre a superfície de Y-TZP (Noda et al., 2010) e também produziu microfraturas e derretimento do material. Estes efeitos são indesejáveis pois fragilizam a zircônia.

Delgado-Ruíz e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos da ablação ultrarrápida por laser de femtossegundos sobre a superfície de implantes dentários

de zircônia. Os autores relataram que o laser de femtossegundos promove uma micro texturização na superfície da zircônia, aumenta a rugosidade e remove contaminantes incorporados nos estágios de fabricação do implante, melhorando suas características de biocompatibilidade. Além disso, as análises por difração de Raios X e por espectrometria mostraram que as áreas ao redor da microtextura promovida pelo laser não exibem a fase de transformação da zircônia, como resultado de um eventual superaquecimento. Portanto, o laser de femtossegundos não fragilizou a zircônia (Delgado-Ruíz et al., 2011).

Não foram encontrados, na literatura, estudos sobre a ação do laser de *erbium-chromium: yttrium, scandium, gallium, garnet* (Er;Cr:YSGG) sobre a superfície da zircônia. Sobre titânio, foi demonstrada sua eficiência na remoção do biofilme (Schwarz et al., 2006) e outros contaminantes orgânicos (Miller, 2004).

Azzeh (2008), em um relato de caso clínico, avaliou um paciente do gênero masculino, 28 anos, não fumante, portador de peri-implantite, no qual foi realizada terapia regenerativa cirúrgica utilizando enxerto ósseo e membrana reabsorvível associados a laser de Er,Cr:YSGG. O paciente apresentava antes do tratamento uma recessão gengival ao redor do implante em região de incisivo central esquerdo, após os exames clínicos e radiográficos foi observado que havia uma recessão de 2 mm e uma profundidade de sondagem de 7 mm, sangramento a sondagem e supuração, além de mobilidade grau I. O tratamento foi realizado utilizando o laser de Er,Cr:YSGG em vários parâmetros para abrir o retalho, remover os tecidos de granulação, perfurar o osso e limpar a superfície do implante. O paciente foi avaliado aos 3, 6, 12 e 18 meses após o tratamento. Após 18 meses observou-se uma profundidade de sondagem de 2mm, redução de 1mm de recessão, ausência de sangramento, supuração e mobilidade, e boa formação óssea (Azzeh M, 2008).

Romanos e colaboradores, em 2006, utilizaram o laser de Er,Cr:YSGG a 1,25W de potência, com refrigeração, sobre discos de titânio com diferentes tratamentos de superfície: maquinado, com cobertura de hidroxiapatita (HA), jateado e com cobertura de plasma spray de titânio. Realizaram cultura de osteoblastos sobre os discos de titânio e, após 3 dias, foram examinados por microscopia eletrônica de varredura. As imagens demonstraram que houve adesão e crescimento celular em todas as amostras (Romanos et al., 2006).

1.4 ADESÃO CELULAR À SUPERFÍCIE DE IMPLANTES: ESTUDOS IN VITRO

Recentemente, experimentos com cultura de células têm se destacado por promoverem um melhor entendimento e controle sobre as interações interfaciais diretas entre as células e as superfícies dos biomateriais. Em particular, culturas de osteoblastos têm sido frequentemente usadas para avaliar o efeito das modificações de superfícies dos implantes dentários sobre o metabolismo e comportamento celular (Romanos et al., 2006).

Dentre os eventos que levam à integração de um implante e, conseqüentemente, ao sucesso ou falha deste dispositivo, a interface implante-tecido desempenha um papel primordial e os osteoblastos, que recobrem a superfície do implante logo após sua instalação, são as células cruciais que regulam a resposta tecidual óssea sobre a superfície do biomaterial (Depprich et al., 2008).

Biomateriais osseointegráveis devem ter uma resposta celular favorável em termos de ligação, adesão, proliferação e diferenciação celulares. As características da superfície como topografia, propriedades químicas ou energia de superfície, desempenham um papel importante na adesão de osteoblastos em biomateriais, especialmente para as fases iniciais, pois este estágio influenciará a capacidade da célula em se proliferar e se diferenciar (Anselme K, 2000).

As respostas celulares sobre os biomateriais têm início na adsorção proteica e em seguida pela fase de ligação celular, a qual envolve ligações físico-químicas entre células e materiais por forças iônicas e forças de Van der Waals. A fase de adesão celular envolve muitas proteínas e moléculas, componentes da matriz extracelular, inicialmente mediada pelas integrinas. A integrina $\beta 1$ é conhecida como a principal subunidade das integrinas envolvidas na adesão de osteoblastos em biomateriais e a adesão celular inicial é mediada por diversas proteínas de ligação (Ko et al., 2007).

A diferenciação osteoblástica geralmente implica na atividade de fosfatase alcalina e de proteínas específicas como osteocalcina, osteopontina e colágeno tipo-1. No osso, a matriz extracelular é composta por diversas proteínas, como colágeno, osteonectina e outras glicoproteínas. Osteonectina é uma glicoproteína fosforilada secretada pela matriz extracelular do tecido ósseo. Está envolvida na ligação de íons

Ca^{2+} e hidroxiapatita durante o processo de mineralização e é um importante marcador e modulador destes mecanismos (Roach, 1994).

No entanto, a topografia da superfície pode influenciar no espreado e crescimento celular, especialmente na fase inicial da proliferação celular. Enquanto sabe-se que a rugosidade da superfície afeta significativamente as interações entre titânio e tecido mineralizado, informações sobre o papel da topografia da superfície da zircônia na resposta dos osteoblastos e do tecido mineralizado são raras (Depprich et al., 2008).

Bächle e colaboradores (2007) avaliaram a adesão de células tipo osteoblasto humano em amostras de zircônia com superfície polida; jateada; jateada e atacada por ácido, e compararam com a tradicional superfície SLA (sigla de termo em inglês, cuja superfície é jateada com partículas de sílica e atacada por ácido) em titânio. Seus resultados mostraram que, independente do tipo de tratamento de superfície, houve boa adesão e proliferação celular, indicando que a zircônia pode ser um bom material para a confecção de implantes osseointegráveis (Bächle et al., 2007).

Wang e colaboradores (2011) avaliaram a biocompatibilidade de substratos de titânio com cobertura de zircônia, depositada por sistema de spray de plasma. Três tipos de superfícies foram desenvolvidas: uma lisa (rugosidade = $0,09 \pm 0,03 \mu\text{m}$) e duas com rugosidade similar ($6,61 \pm 0,50$ e $6,59 \pm 0,58 \mu\text{m}$), porém uma dessas superfícies, em alta magnificação, apresentou nano-grãos de 30 a 50 nm. Portanto, os três tipos de cobertura de zircônia apresentavam as mesmas composições químicas, mas diferentes topografias de superfície. Foi realizada cultura de osteoblastos *in vitro* sobre as superfícies. As superfícies rugosas apresentaram uma maior adesão e proliferação celular que a superfície lisa, comprovando a afinidade e sensibilidade maior dos osteoblastos por uma topografia de superfície rugosa. No entanto, a superfície com topografia nano-estruturada apresentou uma maior e mais rápida taxa de proliferação celular do que a sem partículas nanométricas. Uma vez que a adesão e proliferação celular inicia-se através da interação da superfície com proteínas em escala nanométrica, é possível que uma superfície com topografia de nano partículas possa influenciar a capacidade dos aminoácidos de promover uma maior e mais rápida adesão celular, comparada às superfícies convencionais (Wang et al., 2011).

A adesão e proliferação de osteoblastos sobre superfícies de zircônia (Y-TZP e NanoZr) foram avaliadas por Yamashita e colaboradores (2009) e foram comparadas com superfícies de titânio. Os biomateriais foram preparados com dois tipos de topografia: superfícies lisas ($Ra=0,24\mu m$) e rugosas ($Ra=1,04\mu m$), em que o comportamento de osteoblastos MC3T3-E1 demonstrou que as superfícies rugosas promovem uma maior bioestimulação, aumentando a adesão e proliferação celular quando comparado às superfícies lisas, independentemente do tipo de material em que os implantes foram produzidos (Yamashita et al., 2009).

Esta mesma conclusão, a de que a rugosidade da superfície é primordial na adesão e proliferação celular, também foi demonstrada pelo trabalho de Conserva e colaboradores (2010). Compararam, ainda, dois tipos celulares: células pré-osteoblastos SaOS-2 e células mesenquimais indiferenciadas humanas, não observando diferenças entre elas (Conserva et al., 2010).

Segundo Pae e colaboradores (2011), os tratamentos que promovem determinada rugosidade nas superfícies dos implantes, podem melhorar a adesão inicial dos osteoblastos e sua habilidade em se diferenciar e se proliferar, e desempenham um papel importante no fenômeno da osseointegração. Obtendo-se uma osseointegração mais rápida e mais forte, possibilitam uma melhor ancoragem e um tempo de cicatrização mais curto para o carregamento protético/funcional (Pae et al., 2011).

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar a adesão e proliferação de osteoblastos sobre a superfície de zircônia irradiada por laser de Er,Cr:YSGG.

3. DESENVOLVIMENTO

Essa dissertação, **ANÁLISE *IN VITRO* DA ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS SOBRE A SUPERFÍCIE DA ZIRCÔNIA MODIFICADA POR LASER DE Er,Cr:YSGG (*ERBIUM-CHROMIUM: YTTRIUM, SCANDIUM, GALLIUM, GARNET*)**, gerou o artigo ***IN VITRO* BEHAVIOR OF OSTEÓBLASTS ON ZIRCONIA AFTER ER,CR:YSGG-LASER IRRADIATION**, que será submetido para avaliação no periódico CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH.

IN VITRO BEHAVIOR OF OSTEOBLASTS ON ZIRCONIA AFTER ER,Cr:YSGG-LASER IRRADIATION

Renan Dalla Soares – DDS, Department of Implantology, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil

José Augusto Rodrigues - Department of Restorative Dentistry, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil

Alessandra Cassoni - Department of Restorative Dentistry, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil

Ariadne Cruz – DDS, MSc, PhD, Masters of Science Program in Clinical Dentistry, Positivo University, Curitiba, Brazil.

Claudia O. Simões - DDS, MSc, PhD, Universidade Federal De Sant Caterina, Florianópolis, Brazil,

Alberto Blay - DDS, MSc, Prived Practice.

Paulo Francisco Cesar - DDS, MSc, PhD, Department of Dental Materials, Faculty of Dentistry - Univesity of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

Jamil Awad Shibli - DDS, MSc, PhD, Department of Implantology, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil

Key words: Laser, Er;Cr:YSGG, osteoblasts, zirconia, surface treatment, dental implants, cell culture.

Abstract

Objective: Because of its biocompatibility, strength, and tooth-like color, zirconia material have become an alternative as dental implant to titanium material. The aim of the present study was investigate the adhesion and proliferation of osteoblasts on yttrium-stabilized tetragonal zirconia polycrystal (Y-TZP) surface after Er,Cr:YSGG laser irradiation treatment.

Materials and Methods: Blocks of zirconia Y-TZP were randomized in four groups to laser irradiation: G1= control (no laser irradiation); G2= 1.5W; G3= 3.0W; G4= 5.0W. Each block was treated with Er,Cr:YSGG laser, with air-water irrigation. Blocks of each group were inserted in a 96-well plate. Osteoblast cells MC3T3-E1 were

cultured on the treated surfaces at a plate density of 1×10^4 cells/ml. At the third and seventh day cell proliferation was measured by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay methods. The specimens were prepared to scanning electron microscope (SEM) to observe adhesion and morphology of cells.

Results: After three days of incubation the MTT assay showed adhesion and proliferation of MC3T3-E1 cells in all groups. Compared to Group-1 (control), the Group-2 had a proliferation 1.4% higher ($p > 0.05$), the Group-3 had a proliferation 3.1% higher ($p < 0.05$) and Group-4 had a proliferation 4,5% higher ($p < 0.01$). After seven days there was no difference between the groups (ANOVA, Newman-Keuls). SEM images demonstrated that MC3T3-E1 on all the plates appeared to attach and spread well.

Conclusion: Er,Cr:YSGG laser irradiation may have contributed to the greater and earlier cell spreading that was observed with the Y-TZP surface, however after seven days cell proliferation were similar in both surface.

Introduction

With the increase of elderly population, clinical applications of dental implants are expanding (Buser et al. 1997; Bächle et al. 2007). Titanium has been the largely biomaterial of choice employed in dental implantology (Albrektsson *et al.* 2008). However, the esthetic demands of patients are increasing regarding tooth replacement, especially in the anterior regions and all-ceramic materials are frequently requested for the reconstruction of dental implants, including abutments and crowns, to improve the esthetic result (Kohal et al. 2006).

Zirconia (zirconium dioxide, ZrO_2) is a bio-inert non-resorbable metal oxide with tooth-like color. This material offers improved esthetics results of dental implants (Depprich et al. 2008). Since 2004, all zirconia implants have been distributed and certified on the market (Kohal et al. 2006). The question arising about the choice of titanium use and zirconia (Y-TZP) slowly raises importance (Hisbergues et al. 2009). Zirconia implants present mechanical favorable properties as high strength, hardness, wear resistance, resistance to corrosion, modulus of elasticity similar to steel, coefficient of thermal expansion similar to iron, and elevated fracture toughness, all of interest for biomedical sciences (Piconi et al. 1998; Hisbergues et

al. 2009). Also, zirconia implants restored with the ceramic crowns fulfill the biomechanical requirements for anterior teeth (Glauser et al., 2004; Glauser et al., 2004-b). Tissues around zirconia healing under a lower rate of inflammation-associated processes than titanium (Degidi et al. 2006). Their physical and chemical properties seem to be satisfactory to improve the peri-implant soft tissue compatibility, which is an essential factor in implant success (Akagawa et al. 1998; Kohal et al. 2004). Zirconia (ZrO_2) does not present any cytotoxic effect to hard tissues, is able to interact with osteoblasts by intimate contacts, and makes the cells capable of elaborating the extracellular matrix by synthesizing various essential and structural proteins (Torricelli et al. 2001).

Deprich et al. (2008) showed that primary bovine osteoblasts are able to attach, proliferate and differentiate on zirconia surfaces *in vitro*, suggesting that this ceramic material may also have beneficial effects on biocompatibility and osseointegration when used in patients.

However, the interaction of the cells with the material surface is fundamentally relevant and contributes to osseointegration. Also, the components of cell adhesion are influenced by the surface roughness of the materials, which is able to moderate proliferation, differentiation, matrix production, and calcification of osteoblasts cells (Ko et al., 2007). In addition, surface roughness has an important role in implant success and prognosis. The quality of the first phase of cell–implant interaction will influence the cell proliferation and differentiation. It has been demonstrated that surface modifications of titanium including apatite coating, etching, or anodization can improve initial cell responses (Conserva et al. 2010; Magnani et al. 2003). Thus, it may be necessary to modify the surface of zirconia for the further improvement of initial cell responses (Yamashita et al. 2009).

To obtain a rapid and specific modification of organic and inorganic materials, laser surface processing has aroused growing interest and has been proven to be a controllable and flexible technique for modifying the surface properties of biomaterials (Stübinger et al. 2008). Generally, the laser interaction results in heating followed by cooling of surface material. Hao et al. (2004) showed that an increased surface energy of zirconia (MgOPSZ) bioceramic after CO_2 laser treatment resulted in higher initial cell attachment and enhanced cell growth of human fetal osteoblast cells.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the adhesion and proliferation of osteoblasts on yttrium-stabilized tetragonal zirconia polycrystal (Y-TZP) surface after Er,Cr:YSGG (Erbium-Chromium: Yttrium, Scandium, Gallium, Garnet) laser irradiation treatment.

Materials and Methods

Material and laser processing

Forty-eight blocks of yttrium partially stabilized tetragonal zirconia polycrystal Y-TZP (Vita In-Ceram[®] YZ, Vita-Zahnfabrik, H. Raute GmbH & Co., Bad Säckingen, Germany) were used in this study. This ceramic was composed by 92% ZrO₂, 5% Y₂O₃, HfO₂<3%, and Al₂O₃, SiO₂<1%. Blocks with dimensions of 5x5x2mm were cut from pre-sintered blocks using a low-speed cutting machine (Isomet 1000 Precision Saw; Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) under water cooling. They were sintered in a furnace (VITA ZYrcomat; VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany) at 1,530°C for 7.5h in accordance with the manufacturer's instructions.

The blocks were randomized in four groups to Er,Cr:YSGG laser irradiation (Waterlase[™], Biolase Technology Inc., Irvine, CA, USA; wavelength of 2,780 nm) with different intensities: G1= control (no laser irradiation); G2= 1.5W; G3= 3.0W; G4= 5.0W. Each block was treated for 30s, in focused mode with a G6-type tip, repetition rate fixed on 20 Hz, with air (65%) and water (55%) refrigeration. The beam was aligned to be perpendicular to the target area, and was applied at a 1-mm distance to the surfaces with short movements. Additional specimens of each group was irradiated and evaluated at scanning electron microscopy (SEM).

Surface characterization analysis

After irradiation, the additional specimens of each group were coated with gold sputter (SCD 050; Bal-Tec RG, Balzers, Liechtenstein, Germany) and the surface morphology was observed on SEM (XL30 FEG; Philips, Eindhoven, The Netherlands) with magnification of 1000x.

Cell Culture and Cell Seeding

The specimens were ultrasonically cleaned for 10 min in acetone, ethyl alcohol, and distilled water, and were sterilized in autoclave for 20 min at 121°C under 2 atm. Twelve blocks of each group were inserted in a 96-well plates. MC3T3-E1 Subclone 4 cells (ATCC, Manassas, VA, USA), an immortalized line derived from mouse tissue, were cultured in α -modified minimum essential medium (α -MEM, Nutricell, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, CA, USA) and 1% antibiotic/antifungic (PSA) (Cultilab, SP, Brazil) under standard conditions (at 37°C in 5% CO₂). Cells from passage 13 were used in this study. The cells remain in culture until 100% of confluence. They were trypsinized, clean with α -MEM and the cell concentration was established in 1x10⁴cells/ml. Afterwards, the cells were incubated with different treated surfaces in triplicate, for 3 and 7 days at 37°C in 5% CO₂, with a daily change of culture medium. The cell proliferation was measured by MTT colorimetric assay, and SEM evaluated cell density, at 3 and 7 days.

MTT Colorimetric Assay Methods

MC3T3-E1 cell proliferation after 3 and 7 days was measured by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT test, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) colorimetric assay methods. The wells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and twenty microliters of MTT solution (5 mg/mL) was added in each well. After 3 h of incubation at 37°C, at 5% CO₂, the supernatant was removed and 150 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to each well. The absorbance of this colored solution in each well, representing the number of viable cells, was measured using a spectrophotometer (EL800, Bio-Tek, Winooski, VT, USA) at a wavelength of 540 nm.

Cellular morphology

The MC3T3-E1 cells cultured on all groups zirconia surfaces, for 3 and 7 days were observed by SEM. Cells were rinsed with PBS and fixed in 4% glutaraldehyde solution for 3 hours. The samples were washed with PBS and dehydrated in ascending concentration of ethanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, and

100%). The dehydrated samples were subjected to critical point dried (CPD-030, Balzers AG, Liechtenstein, Germany), and then coated with gold sputter (SCD 050; Bal-Tec RG, Balzers, Liechtenstein, Germany) for SEM observation and photographed at 1000X of magnification to qualitatively evaluate cellular morphology.

Statistical Analysis

Data relative to MTT assay at 3 and 7 days were tested with non-parametric one-way analysis of variance (ANOVA) with differences assessed using the Student Newman–Keuls post hoc test and a confidence interval of 95% was adopted. All analyses were performed using GraphPad InStat 3 software (Graph Pad Software Inc, CA, USA). Statistical differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Surface characterization analysis

SEM examination showed that there was no significant difference in surface morphology between all parameter laser treated zirconia and the control group (Fig. 1 and 2).

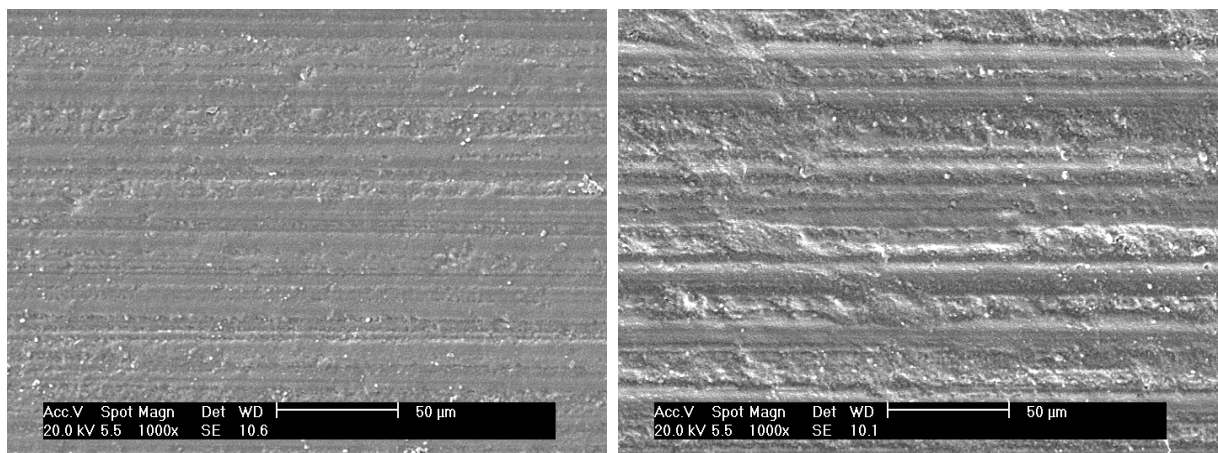


Figure 1. Micrograph images obtained for irradiated Y-TZP zirconia material G1 (control) and G2 (1.5W), 1000X.

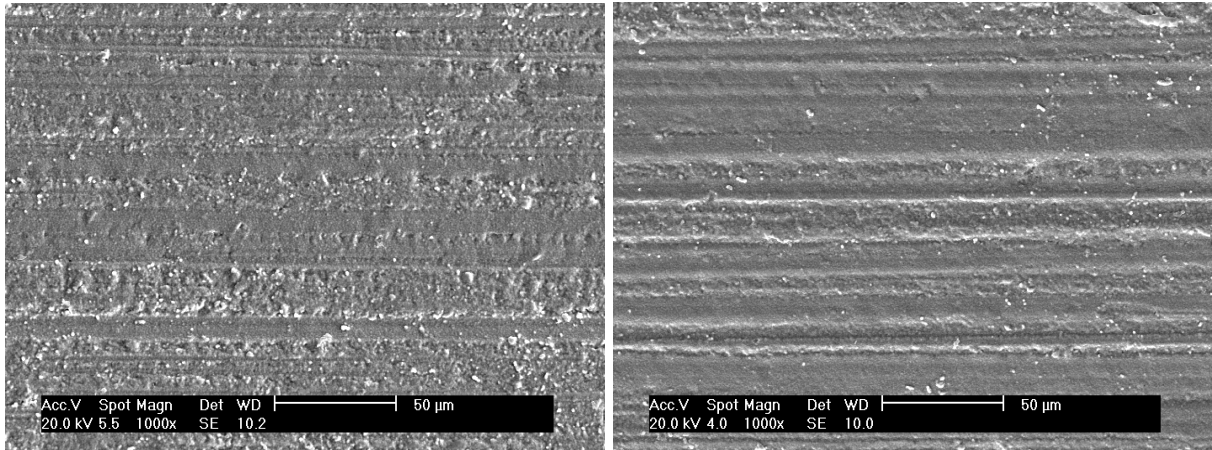


Figure 2. Micrograph images obtained for irradiated Y-TZP zirconia material G3 (3.0W) and G4 (5.0W), 1000X.

Cell proliferation

After three days of incubation the MTT assay showed proliferation of MC3T3-E1 cells in all groups. Compared to Group-1 (control), the Group-2 had a proliferation 1.4% higher ($p>0.05$), the Group-3 had a proliferation 3.1% higher ($p<0.05$) and Group-4 had a proliferation 4.5% higher ($p<0.01$). After seven days there was no difference between the groups (Table 1).

Table 1- Percentage mean, standard deviation of cell proliferation and results of post-hoc Newman-Keuls test.

	G1= Control	G2= 1.5W	G3= 3.0W	G4= 5.0W
3-days	100%A	101.4%(±0.5)AB	103.3%(±0.3)B	104.5%(±1.8)C
7-days	100%	94.4%(±13.6)	98.5 (±4.3)	103.8 (±2.1)

Means followed by different upper case letter at row indicate statistical differences ($p < 0.05$).

Cell morphology

SEM analyzed the morphology of MC3T3-E1 cells in all groups after 3 and 7

days of culture. Cells on all surfaces appeared to be well spread at both time points and a cell layer was observed. Dendritic projections and filopodia could also be seen over the surfaces, representing focal adhesion points. In addition, the cells were closer to one another (Fig. 3 and 4).

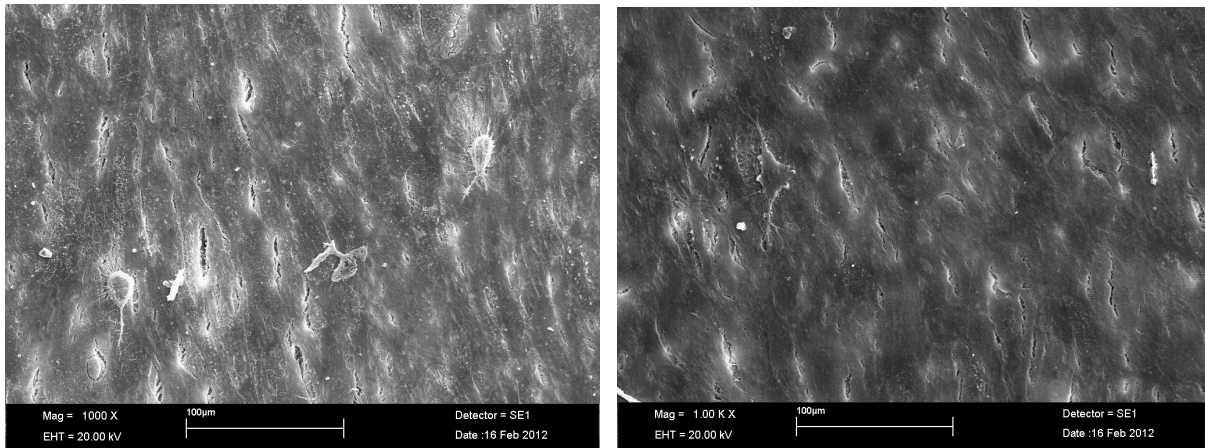


Figure 3. Micrograph images shows the attachment of MC3T3-E1 on the zirconia surface after 7 days of culture G1 (control) and G2 (1.5W), 1000X.

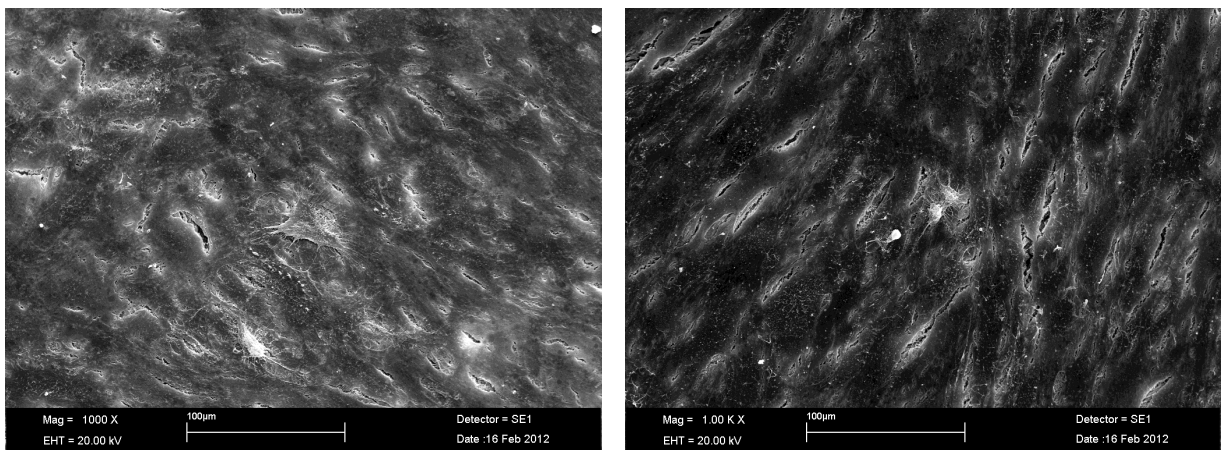


Figure 4. Micrograph images shows the attachment of MC3T3-E1 on the zirconia surface after 7 days of culture G3 (3.0W) and G4 (5.0W), 1000X.

Discussion

A parameter of major importance for the clinical success of dental implants is the establishment of a direct contact between the implant and the surrounding bone. Implant chemistry and surface topography is thought to influence the implant-bone response. Since bone is the essential structure of implants integration, biocompatibility tests using constitutive elements of this tissue, like osteoblasts cells, revealed to be important to predict the clinical success (Hisbergues et al. 2009).

This study evaluated the behavior of osteoblast cells on Y-TZP zirconia surface treated with Er,Cr:YSGG laser. Since the attachment phase occurs rapidly and involves short-term events like physico-chemical linkages between cells and materials involving ionic forces and van der Waals forces (Bachle et al., 2007), the specimens of the present study were harvested at the third and seventh days for analysis.

At the third day, more osteoblasts cells proliferations were observed on the Y-TZP zirconia surface in the G4. This group was irradiated with the highest laser dose (5.0W). By the other side, the osteoblasts cells population in the G2 that was irradiated with the lowest dose (1.5W) proliferated similarly to unlased control group. However, G2 showed intermediary results and did not differ from G3 (3.0W), which showed osteoblasts cells population higher than control group. Also, G3 showed lesser osteoblasts cells proliferation than G4.

Comparing the cells response to laser doses irradiation, groups G2, G3, and G4 showed respectively a 1.4%, 3.1%, and 4.5% higher osteoblasts population than control group, this way it can be supposed that higher the laser dose higher the osteoblast cells proliferation at this stage of earlier attachment. Yamashita et al. (2009) also showed that zirconia improves cell proliferation significantly during the first days of culture, but it does not improve attachment and adhesion strength (Yamashita et al 2009).

However, at the seventh day there were no differences in the viable osteoblasts population among the experimental groups and control group. It can be supposed that Er,Cr:YSGG laser improves cell proliferation significantly during the three first days of culture facilitating osteoblast cells adhesion to zirconia but after all surface adhesion the cell reach a similar proliferation rate. Although, the laser

treatment may improve the quality of the first phase of cell-material interaction which will improve the cell capacity to differentiate and may favor osseointegration.

Furthermore, it was suggested that the surface roughness of zirconia specimens is an important factor to accelerate the initial attachment of osteoblasts, similar to titanium and the expression of integrin $\alpha 5$ and $\beta 1$ was enhanced for rough surface specimens of zirconia (Yamashita et al 2009). Also, initial cell adhesion on the material surface occurs through mechanical interlocking, which can produce beneficial mechanical interlocking at the initial adhesion stage and aid cell adhesion. Bächle et al (2007), using discs with different surface roughening of Y-TZP on CAL-72 osteoblast-like cells, could demonstrate a change in proliferation after three days in relation with the surface.

However, by SEM analysis the Er,Cr:YSGG laser treated zirconia showed similar morphology to control group. The desired effect of laser energy in a material is the absorption of the laser energy which is the conversion of light energy into heat. The heat will act on the substrate producing chemical, mechanical or physical alterations. This effect may also be modified by the elapsed time between the energy pulse, which permits the releasing of the heat and cooling, for subsequent energy and heating (Hao et al., 2004). Moreover, the absorption of laser energy by zirconia might be compromised since these ceramics are water-free materials and have a white, opaque color (Subası & Inan, 2011), consequentially there is the need to employ high energy densities to produce effects.

Hao et al. (2005) analyzed the effect of CO₂ laser-modified zirconia on human fetal osteoblasts cell adhesion and could demonstrate a better adhesion *in vitro* after laser treatment, most likely because of a change in the wettability characteristics of the Y-TZP. However, the surface also showed topography alterations with pits and fissures that could have impaired mechanical properties. Subası & Inan (2011) treated Y-TZP zirconia with 400 mJ Er:YAG laser and observed rougher surfaces than the control group. By SEM analysis Er:YAG laser slightly changed the surface morphology of zirconia with the formation of rare pits when compared to the control group.

To solve the problem of laser absorption by Y-TZP zirconia, Cavalcanti et al. (2009) coated with graphite powder the material for improve the absorption of laser energy on the target surface. They used three different Er:YAG laser parameters

(200, 400, and 600 mJ) on zirconia and suggested that the lower energy intensity (200 mJ) might be a potential method of rough Y-TZP zirconia surface.

However, SEM micrographs showed no morphological differences among Y-TZP zirconia surface Er,Cr:YSGG laser irradiated besides the increase of laser dose from 1.5W, 3.0W to 5.0W and observations of osteoblast-like cell morphology showed good adhesion and spreading of the cells on the various surfaces, this way the biocompatibility of an implant material depends on its chemical, physical, and structural properties (Bachle et al. 2007), it seems that Er,Cr:YSGG influence the cell response to Y-TZP zirconia surface by means of chemical or physical alteration.

Conclusions

Within the limitation of the present study, the following conclusions can be drawn:

- the surfaces of Y-TZP zirconia investigated allow cell adhesion and proliferation and, therefore, the possibility of use as a biomaterial for dental implant.
- Er,Cr:YSGG laser irradiation may have contributed to the greater and earlier cell spreading that was observed with the Y-TZP surface, however after seven days cell proliferation were similar in both surface.

Acknowledgment

The authors of this study would like to thank Dr. Kitagima and Dr. Tanaka (NAP/MEPA – College of Agriculture “Luiz de Queiroz” – University of Sao Paulo) for SEM equipment support.

References

Akagawa, Y., Hosokawa, R., Sato Y., Kamayama, K. (1998) Comparison between freestanding and tooth-connected partially stabilized zirconia implants after two years' function in monkeys: a clinical and histologic study. *Journal of Prosthetic Dentistry* **80**(5): 551-8.

Albrektsson, T., Sennerby, L., Wennerberg, A. (2008) State of the art of oral implants. *Periodontology 2000* **47**: 15-26.

Bächle, M., Butz, F., Hübner, U., Bakalinis, E., Kohal, R.J. (2007) Behavior of CAL72 osteoblast-like cells cultured on zirconia ceramics with different surface topographies. *Clinical Oral Implants Research* **18**(1): 53-9.

Buser, D., Mericske-Stern, R., Bernard, J.P., Behneke, A., Behneke, N., Hirt, H.P., Belser, U.C. & Lang, N.P. (1997) Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clinical Oral Implants Research* **8**: 161–172.

Cavalcanti, A.N., Pilecki, P., Foxton, R.M., Watson, T.F., Oliveira, M.T., Gianinni, M., Marchi, G.M. (2009) Evaluation of the surface roughness and morphologic features of Y-TZP ceramics after different surface treatments. *Photomedicine and Laser Surgery* **27**: 473–479.

Conserva, E., Lanuti, A., Menini, M. (2010) Cell behavior related to implant surfaces with different microstructure and chemical composition: an in vitro analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **25**(6): 1099-107.

Degidi, M., Artese, L., Scarano, A., Perrotti, V., Gehrke, P., Piattelli, A. (2006) Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *Journal of Periodontology* **77**(1): 73-80.

Depprich, R., Ommerborn, M., Zipprich, H., Naujoks, C., Handschel, J., Wiesmann, H.P., Kübler, N.R., Meyer, U. (2008) Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head & Face Medicine* **8**: 4-29.

Glauser, R., Sailer, I., Wohlwend, A., Studer, S., Schibli, M., Schärer, P. (2004) Experimental zirconia abutments for implant-supported single-tooth restorations in esthetically demanding regions: 4-year results of a prospective clinical study. *The International Journal of Prosthodontics* **17**(3): 285-90.

Glauser, R., Wohlwend, A., Studer, S. (2004) Application of zirconia abutments on single-tooth implants in the maxillary esthetic zone. A 6-year clinical and radiographic follow-up report. *Applied Osseointegration Research* **4**: 41–45 (b).

Hao, L., Lawrence, J., Lim, G.C., Zheng, H.Y. (2004) Examination of CO₂ laser-induced rapid solidification structures on magnesia partially stabilised zirconia and the effects thereof on wettability characteristics. *Optics and Lasers in Engineering* **42**: 355–374.

Hao, L., Lawrence, J., Chian, K.S. (2005) Osteoblast cell adhesion on a laser modified zirconia based bioceramic. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **16**(8): 719-26

Hisbergues, M., Vendeville, S., Vendeville, P. (2009) Zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* **88**(2): 519-29.

Ko, H.C., Han, J.S., Bächle, M., Jang, J.H., Shin, S.W., Kim, D.J. (2007) Initial osteoblast-like cell response to pure titanium and zirconia/alumina ceramics. *Dental Materials* **23**(11): 1349-55.

Kohal, R.J., Weng, D., Bächle, M. & Strub, J.R. (2004) Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment. *Journal of Periodontology* **75**: 1260–1266.

Kohal, R.J., Klaus, G., Strub, J.R. (2006) Zirconia-implant-supported all-ceramic crowns withstand long-term load: a pilot investigation. *Clinical Oral Implants Research* **17**(5): 565-71.

Magnani, A., Priamo, A., Pasqui, D., Barbucci, R. (2003) Cell behavior on chemically microstructured surfaces. *Materials Science and Engineering: C* **23**.

Piconi, C., Burger, W., Richter, H.G., Cittadini, A., Maccauro, G., Covacci, V., Bruzzese, N., Ricci, G.A., Marmo, E. (1998) Y-TZP ceramics for artificial joint replacements. *Biomaterials* **19**(16): 1489-94.

Stübinger, S., Homann, F., Etter, C., Miskiewicz, M., Wieland, M., Sader, R. (2008) Effect of Er:YAG, CO(2) and diode laser irradiation on surface properties of zirconia endosseous dental implants. *Lasers in Surgery and Medicine* **40**(3): 223-8.

Subaşı, M.G., Inan, O. (2011) Evaluation of the topographical surface changes and roughness of zirconia after different surface treatments. *Lasers in Medical Science* **24**.

Torricelli, P., Verne', E., Brovarone, C.V., Appendino, P., Rustichelli, F., Krajewski, A., Ravaglioli, A., Pierini, G., Fini, M., Giavaresi, G., Giardino, R. (2001) Biological glass coating on ceramic materials: In vitro evaluation using primary osteoblast cultures from healthy and osteopenic rat bone. *Biomaterials* **22**: 2535–2543.

Yamashita, D., Machigashira, M., Miyamoto, M., Takeuchi, H., Noguchi, K., Izumi, Y., Ban, S. Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia. *Dental Materials Journal* **28**(4): 461-70.

4. CONCLUSÕES

As superfícies de zircônia, investigadas neste estudo, permitiram a adesão e proliferação de osteoblastos, indicando que a cerâmica Y-TZP é um biomaterial promissor na confecção de implantes dentários.

A irradiação com laser de Er,Cr:YSGG contribuiu para uma maior e mais precoce adesão e proliferação celular sobre as superfícies de Y-TZP. No entanto, após sete dias, a proliferação celular foi similar sobre as superfícies irradiadas e não irradiadas.

5. REFERÊNCIAS

Ahmad I. Yttrium-partially stabilized zirconium dioxide posts: an approach to restoring coronally compromised nonvital teeth. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998 Oct; 18 (5): 454-65.

Akagawa Y, Hosokawa R, Sato Y, Kamayama K. Comparison between freestanding and tooth-connected partially stabilized zirconia implants after two years' function in monkeys: a clinical and histologic study. *J Prosthet Dent* 1998 Nov; 80 (5): 551-8.

Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthop Scand* 1981; 52: 155–170.

Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. *Periodontol* 2000. 2008; 47: 15-26.

Andreiotelli M, Wenz HJ, Kohal RJ. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. *Clin Oral Implants Res* 2009 Sep; 20 Suppl 4: 32-47.

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000 Apr; 21 (7): 667-81. Review.

Azzeh MM. Er, Cr: YSGG Laser-assisted surgical treatment of peri-implantitis with 1-year reentry and 18-month follow-up. *J Periodontol* 2008; 79: 2000-2005.

Bächle M, Butz F, Hübner U, Bakaliniš E, Kohal RJ. Behavior of CAL72 osteoblast-like cells cultured on zirconia ceramics with different surface topographies. *Clin Oral Implants Res* 2007 Feb; 18 (1): 53-9.

Bressan E, Paniz G, Lops D, Corazza B, Romeo E, Favero G. Influence of abutment material on the gingival color of implant-supported all-ceramic restorations: a

prospective multicenter study. *Clin Oral Implants Res* 2011 Jun; 22 (6): 631-7.

Butz F, Ogawa T, Nishimura I. Interfacial shear strength of endosseous implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011 Jul-Aug; 26 (4): 746-51.

Conserva E, Lanuti A, Menini M. Cell behavior related to implant surfaces with different microstructure and chemical composition: an in vitro analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010 Nov-Dec; 25 (6): 1099-107.

Delgado-Ruíz RA, Calvo-Guirado JL, Moreno P, Guardia J, Gomez-Moreno G, Mate-Sánchez JE, Ramirez-Fernández P, Chiva F. Femtosecond laser microstructuring of zirconia dental implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011 Jan; 96 (1): 91-100.

Deprich R, Ommerborn M, Zipprich H, Naujoks C, Handschel J, Wiesmann HP, Kübler NR, Meyer U. Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head Face Med* 2008 Dec; 8: 4-29.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998 Jun; 106 (3): 721-64.

Ferguson SJ, Brogini N, Wieland M, de Wild M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Buser D. Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface. *J Biomed Mater Res A* 2006 Aug; 78 (2): 291-7.

Gahlert M, Röhling S, Wieland M, Sprecher CM, Kniha H, Milz S. Osseointegration of zirconia and titanium dental implants: a histological and histomorphometrical study in the maxilla of pigs. *Clin Oral Implants Res* 2009 Nov; 20 (11): 1247-53.

Gahlert M, Burtscher D, Grunert I, Kniha H, Steinhauser E. Failure analysis of

fractured dental zirconia implants. *Clin Oral Implants Res* 2012 Mar; 23 (3): 287-93.

Glauser R, Sailer I, Wohlwend A, Studer S, Schibli M, Schärer P. Experimental zirconia abutments for implant-supported single-tooth restorations in esthetically demanding regions: 4-year results of a prospective clinical study. *Int J Prosthodont*. 2004 May-Jun; 17 (3): 285-90.

Glauser R, Wohlwend A, Studer S. Application of zirconia abutments on single-tooth implants in the maxillary esthetic zone. A 6-year clinical and radiographic follow-up report. *Applied Osseointegration Research* 2004-b; 4: 41–45.

Hao L, Lawrence J, Lim GC, Zheng HY. Examination of CO₂ laser-induced rapid solidification structures on magnesia partially stabilized zirconia and the effects thereof on wettability characteristics. *Optics and Lasers in Engineering* 2004; 42: 355–374

Hao L, Lawrence J. On the role of CO₂ laser treatment in the human serum albumin and human plasma fibronectin adsorption on zirconia (MGO-PSZ) bioceramic surface. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jun 15; 69 (4): 748-56.

Hao L, Lawrence J, Chian KS. Osteoblast cell adhesion on a laser modified zirconia based bioceramic. *J Mater Sci Mater Med* 2005 Aug; 16 (8): 719-26

Hao L, Lawrence J. Effects of Nd:YAG laser treatment on the wettability characteristics of a zirconia-based bioceramic. *Optics and Lasers in Engineering* 2006; 44: 803–814.

Heydecke G, Kohal R, Gläser R. Optimal esthetics in single-tooth replacement with the Re-Implant system: a case report. *Int J Prosthodont*. 1999 Mar-Apr; 12 (2): 184-9.

Hisbergues M, Vendeville S, Vendeville P. Zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009 Feb; 88 (2): 519-29.

Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* 2004 Dec; 25 (28): 5947-54.

Ko HC, Han JS, Bächle M, Jang JH, Shin SW, Kim DJ. Initial osteoblast-like cell response to pure titanium and zirconia/alumina ceramics. *Dent Mater* 2007 Nov; 23 (11): 1349-55.

Kohal, R.J., Weng, D., Bächle, M. & Strub, J.R. Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment. *Journal of Periodontology* 2004; 75: 1260–1266.

Kohal RJ, Klaus G, Strub JR. Zirconia-implant-supported all-ceramic crowns withstand long-term load: a pilot investigation. *Clin Oral Implants Res* 2006 Oct; 17 (5): 565-71.

Kohal RJ, Att W, Bächle M, Butz F. Ceramic abutments and ceramic oral implants. An update. *Periodontology* 2000. 2008; 47: 224-43.

Lange R, Lüthen F, Beck U, Rychly J, Baumann A, Nebe B. Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomol Eng.* 2002 Aug; 19 (2-6): 255-61.

Magnani A, Priamo A, Pasqui D, Barbucci R. Cell behavior on chemically microstructured surfaces. *Mater Sci Eng C* 2003; 23.

Marković A, Calvo-Guirado JL, Lazić Z, Gómez-Moreno G, Calasan D, Guardia J, Colic S, Aguilar-Salvatierra A, Gačić B, Delgado-Ruiz R, Janjić B, Mišić T. Evaluation of Primary Stability of Self-Tapping and Non-Self-Tapping Dental Implants. A 12-Week Clinical Study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011; Dec 15.

Miller RJ. Treatment of the contaminated implant surface using the Er;Cr:YSGG laser. *Implant Dentistry* 2004; 13 (2).

Noda M, Okuda Y, Tsuruki J, Minesaki Y, Takenouchi Y, Ban S. Surface damages of zirconia by Nd:YAG dental laser irradiation. *Dent Mater J* 2010 Oct 14; 29 (5): 536-41. Epub 2010 Sep 18.

Oliva J, Oliva X, Oliva JD. One-year follow-up of first consecutive 100 zirconia dental implants in humans: a comparison of 2 different rough surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007 May-Jun; 22 (3): 430-5.

Oliva J, Oliva X, Oliva JD. Five-year success rate of 831 consecutively placed Zirconia dental implants in humans: a comparison of three different rough surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010 Mar-Apr; 25 (2): 336-44.

Osman RB, Ma S, Duncan W, De Silva RK, Siddiqi A, Swain MV. Fractured zirconia implants and related implant designs: scanning electron microscopy analysis. *Clin Oral Implants Res* 2012 Jan 26. (Epub ahead of print)

Pae A, Kim SS, Kim HS, Woo YH. Osteoblast-like cell attachment and proliferation on turned, blasted, and anodized titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011 May-Jun; 26 (3): 475-81.

Piconi C, Burger W, Richter HG, Cittadini A, Maccauro G, Covacci V, Bruzzese N, Ricci GA, Marmo E. Y-TZP ceramics for artificial joint replacements. *Biomaterials* 1998 Aug; 19 (16): 1489-94.

Puleo DA, Thomas MV. Implant surfaces. *Dent Clin North Am* 2006 Jul; 50 (3): 323-38.

Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int* 1994 Jun; 18 (6): 617-28

Romanos G, Crespi R, Barone A, Covani U. Osteoblast attachment on titanium disks after laser irradiation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006 Mar-Apr; 21 (2): 232-6.

Sennerby L, Dasmah A, Larsson B, Iverhed M. Bone tissue responses to surface-modified zirconia implants: A histomorphometric and removal torque study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; 7 Suppl 1: S13-20.

Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen JA, Creugers NH. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *J Dent Res* 2006 Jun; 85 (6): 496-500.

Shibli JA, Grassi S, Piattelli A, Pecora GE, Ferrari DS, Onuma T, d'Avila S, Coelho PG, Barros R, Iezzi G. Histomorphometric evaluation of bioceramic molecular impregnated and dual acid-etched implant surfaces in the human posterior maxilla. *Clin Implant Dent Relat Res* 2010 Dec; 12 (4): 281-8.

Shibli JA, Mangano C, D'Avila S, Piattelli A, Pecora GE, Mangano F, Onuma T, Cardoso LA, Ferrari DS, Aguiar KC, Iezzi G. Influence of direct laser fabrication implant topography on type IV bone: a histomorphometric study in humans. *J Biomed Mater Res A* 2010-b May; 93 (2): 607-14.

Shibli JA, Grassi S, de Figueiredo LC, Feres M, Iezzi G, Piattelli A. Human peri-implant bone response to turned and oxidized titanium implants inserted and retrieved after 2 months. *Implant Dent* 2007 Sep; 16 (3): 252-9.

Schwarz F, Nuesry E, Bieling K, Herten M, Becker J. Influence of an erbium, chromium-doped yttrium, scandium, gallium, and garnet (Er,Cr:YSGG) laser on the reestablishment of the biocompatibility of contaminated titanium implant surfaces. *J Periodontol* 2006 Nov; 77 (11): 1820-7.

Steinemann SG. Titanium--the material of choice? *Periodontol* 2000. 1998 Jun; 17: 7-21.

Stübinger S, Homann F, Etter C, Miskiewicz M, Wieland M, Sader R. Effect of Er:YAG, CO(2) and diode laser irradiation on surface properties of zirconia endosseous dental implants. *Lasers Surg Med* 2008 Mar; 40 (3): 223-8.

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000 Sep-Oct; 15 (5): 675-90.

Tinschert J, Natt G, Mohrbotter N, Spiekermann H, Schulze KA. Lifetime of alumina- and zirconia ceramics used for crown and bridge restorations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 80: 317-21.

Wang G, Liu X, Zreiqat H, Ding C. Enhanced effects of nano-scale topography on the bioactivity and osteoblast behaviors of micron rough ZrO₂ coatings. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011 Sep 1; 86 (2): 267-74.

Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009 Sep; 20 Suppl 4: 172-84.

Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E. Effect of surface topology on the osseointegration of implant material in trabecular bone. *Biomaterials* 1995; 29: 1567-1575.

Yamashita D, Machigashira M, Miyamoto M, Takeuchi H, Noguchi K, Izumi Y, Ban S. Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia. *Dent Mater J* 2009 Jul; 28 (4): 461-70.

Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl R, Geis-Gerstorfer J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials* 2004 Aug; 25 (18): 4087-103.