

Francisco Mauro da Silva Girundi

Interações entre Proteínas Salivares e Discos de Titânio

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares

Belo Horizonte

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

G446i Girundi, Francisco Mauro da Silva
Interações entre proteínas salivares e discos de titânio / Francisco Mauro da Silva
Girundi. Belo Horizonte, 2008.
48f. : il.

Orientador: Rodrigo Villamarim Soares
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Implantes dentários. 2. Titânio. 3. Proteínas salivares. 4. Especificidade. 5. Osseointegração. I. Soares, Rodrigo Villamarim. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314-089.28

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Aos meus amados filhos Ana e Pedro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado.

A minha esposa Rose, companheira de todos os momentos, meu amor e minha gratidão.

Aos meus pais José e Perpétua, pelos belos exemplos, pelo amor e pela torcida.

Ao meu orientador professor Rodrigo Villamarim Soares, profissional sério, competente, exigente. Agradeço a oportunidade de compartilhar desse trabalho e aprender não somente pesquisa, mas também valores que servirão por toda minha vida.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia da Puc-Minas pela disponibilidade, atenção e agradável convivência.

Aos meus amigos do Mestrado pela convivência e apoio mútuo.

As secretárias da pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Puc-Minas Angélica e Silvânia, pela colaboração constante.

Aos funcionários da biblioteca Regilena e Leonardo, pelo empenho nas buscas das referências necessárias.

Ao professor Arnaldo por ter feito o coletor de saliva utilizado na pesquisa.

A Giselle, Juliana e Marina pela colaboração na realização de toda fase laboratorial.

RESUMO

As proteínas salivares apresentam especificidade de aderência à superfície dentária assim como a biomateriais e microorganismos. Adicionalmente, possuem propriedades antibacterianas, antimicóticas, fungicidas e antiinflamatórias. O objetivo deste estudo foi investigar interações entre proteínas salivares e discos de titânio divididos em 4 grupos específicos (G-I discos polidos; G-II discos tratados com ácido; G-III discos tratados com ácido e jateados; G-IV discos tratados com ácido, jateados e revestidos). Os discos foram incubados com amostras de saliva de um único doador e as proteínas presentes nas amostras, assim como as que não interagiram com a superfície dos discos, foram quantificadas por meio de um espectrofotômetro. Adicionalmente, amostras foram submetidas à eletroforese, coradas por Coomassie blue ou transferidas eletroforeticamente para membranas de nitrocelulose expostas a anticorpos direcionados contra MG2 ou lactoferrina. Diferenças significativas na concentração total das proteínas entre os grupos foram observadas ($p < 0,05$; ANOVA bifatorial; Teste de Fisher) e os resultados revelaram que a adsorção proteica a G-III e G-IV foi maior que a G-I e G-II. Bandas de proteínas salivares coradas por Coomassie-Blue indicaram a presença da lactoferrina, peroxidase, amilase e de PRPs nas superfícies dos discos de todos os grupos. Western blots revelaram que G-I apresentou a menor interação com a MG2 e lactoferrina, e em contraste, G-III a maior com a MG2 e G-IV a maior com a lactoferrina. Os resultados do presente estudo indicam que a adsorção de proteínas salivares aos discos de titânio com características superficiais distintas exibe variações. Conseqüentemente, sugere-se que o biofilme microbiano formado sobre as superfícies poderia apresentar diferenças quantitativas e qualitativas, e assim sendo indicam que osseointegração e taxas de sucesso distintas poderiam ocorrer nos implantes de titânio com estes tratamentos superficiais.

Palavras Chave: *implantes de titânio, proteínas salivares, interações moleculares, especificidade, tratamentos de superfície, osseointegração*

ABSTRACT

Salivary proteins exhibit specific adherence properties to dental surfaces, biomaterials and microorganisms. Additionally display antibacterial, antimycotic, antifungal and anti-inflammatory properties. The aim of this study was to investigate interactions between salivary proteins and titanium discs that according to their surface characteristics, were divided in 4 specific groups (G-I polished discs; G-II discs submitted to acid; G-III etched discs submitted to acid; G-IV etched discs submitted to acid and possessing a layer of nanometric particles). Discs were incubated with saliva samples from one donor and the proteins that were present on these samples as well as others that did not interact with the discs were quantified with a spectrophotometer. Additionally, samples were submitted to electrophoresis, stained by Coomassie blue or transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes exposed to antibodies directed against MG2 or lactoferrin. Significant differences among groups in the total protein concentration were observed ($p < 0.05$; ANOVA two-way; Fisher's Test), a result that revealed that protein adsorption to G-III and G-IV was superior than to G-I and G-II. Salivary protein bands stained by Coomassie blue indicate the presence of lactoferrin, peroxidase, amylase and PRPs on discs surfaces of all groups. Western blots revealed that G-I showed the smallest interaction with MG2 and lactoferrin and in contrast G-III the greatest with MG2 and G-IV with lactoferrin. The results from the present study indicate that salivary protein adsorption to discs with distinct surface characteristics is different. Consequently, they suggest that the biofilm formed on these surfaces could show quantitative and qualitative differences on its microbiota, and therefore indicate that differential osseointegration and success rates of titanium implants with these surface treatments could occur.

Palavras Chave: *titanium implants, salivary proteins, molecular interactions, specificity, surface treatments, osseointegration*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos.....	10
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
REFERÊNCIAS.....	15
ARTIGO CIENTÍFICO	211
ANEXOS	212

1 INTRODUÇÃO

Ao final dos anos 60 Branemark e colaboradores iniciaram o desenvolvimento de implantes que, para a função clínica, dependiam de uma ancoragem direta no osso, denominada anos depois de osseointegração. Experimentos em animais indicaram claramente que a ancoragem direta do implante ao tecido ósseo seria possível desde que algumas diretrizes definidas fossem seguidas (BRANEMARK *et al.*, 1969; BRANEMARK *et al.*, 1977). Posteriormente, através de técnicas desenvolvidas para cortar cuidadosamente o osso não-descalcificado e o implante, a existência de contato direto entre ambos foi comprovada (SCHROEDER *et al.*, 1976). O implante apresenta uma estabilidade mecânica primária, alcançada pela pressão de inserção e, a osseointegração foi definida como sendo o processo pelo qual a fixação rígida e clinicamente assintomática de materiais aloplásticos é realizada e mantida no osso em presença de cargas funcionais (ZARB; ALBREKTSSON, 1990).

A *American Society For Testing And Materials* (ASTMF) define comercialmente o grau de pureza do implante de titânio de acordo com a porcentagem máxima de oxigênio presente. O titânio puro e as suas ligas são os materiais de escolha para os implantes, intermediários e cicatrizadores (ADA COUNCIL ON SCIENTIFIC AFFAIRS, 2003). Os fenômenos ocorridos na interface material-tecido imediatamente após sua inserção são de grande importância na obtenção de um desempenho favorável do biomaterial (THULL, 2002; KOHAVI *et al.*, 1997). Neste contexto, a quantidade e qualidade da adesão de moléculas distintas sobre a superfície do implante, intermediário ou cicatrizador também são importantes para o sucesso clínico dos implantes e deve ser ressaltado que a cicatrização da ferida na interface implante-tecido mole ocorre na presença de sangue e saliva (ZÖLLER; ZENTNER, 1996).

A saliva é um fluido que mantém a saúde oral e protege tecidos moles e duros da cavidade oral de irritações químicas, térmicas e mecânicas (SREEBNEY, 1989). Existem relatos de interações entre proteínas salivares e superfícies de titânio (EDGERTON *et al.*, 1996; KOHAVI *et al.*, 1997; STEINBERG *et al.*, 1996). Particularmente a amilase salivar, proteínas ricas em prolina, a imunoglobulina-A

secretora (SIgA) e a mucina glicoproteína - 1 (MG1) são componentes da película adquirida formada sobre o titânio, e que essas proteínas permitiriam a ocorrência de interações específicas com determinados microorganismos (EDGERTON *et al.*, 1996).

Implantes saudáveis possuem microbiota subgengival semelhante a dos dentes naturais com saúde periodontal, entretanto exames mais detalhados da microbiota ao redor dos mesmos revelaram proporções distintas de bactérias (NAKOU *et al.*, 1987; APSE *et al.*, 1989; MOMBELLI *et al.*, 1988). As características da película adquirida formada sobre as superfícies dos implantes modulam quais microorganismos poderão se aderir à mesma, e esse fenômeno pode explicar diferenças observadas na resposta tecidual ao redor dos dentes e de implantes de titânio, assim como em relação ao sucesso da osseointegração (STEINBERG, 1995). É importante destacar que o biofilme bacteriano sobre os implantes é fundamental na patogênese da doença periimplantar (YOSHINARI *et al.*, 2000).

Assim sendo, a busca da melhor característica superficial do titânio para os implantes e componentes intermediários transmucosos tem sido objeto de investigação científica (NAKAZATO *et al.*, 1989; QUIRYNEN *et al.*, 1990; QUIRYNEN *et al.*, 1993). A rugosidade superficial foi sugerida como sendo mais importante que a energia superficial livre na formação do biofilme sobre implantes de titânio (NAKAZATO *et al.*, 1989; QUIRYNEN *et al.*, 1990; QUIRYNEN *et al.*, 1993). Estudos *in vivo* reportaram que a colonização bacteriana em superfícies rugosas de titânio é maior que em superfícies lisas (QUIRYNEN e BOLLEN, 1995; BOLLEN *et al.*, 1996) e características superficiais dos materiais de implante influenciaram também na formação e quantidade do biofilme (WU-YUAN *et al.*, 1995).

Os estudos descritos acima evidenciam que biomateriais têm diferentes propriedades químicas e energia livre superficial. A adsorção dos componentes salivares a estes exibe especificidade e modula a formação de um biofilme sobre as superfícies presentes. O titânio utilizado na implantodontia apresenta variedades inerentes à composição, desenho geométrico e tratamento da superfície. Portanto é de grande interesse ampliar o conhecimento das interações entre proteínas salivares e implantes de titânio, avaliar a quantidade total de interações assim como determinar componentes específicos que possam estar presentes na película adquirida formada sobre implantes com características distintas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar interações das proteínas salivares com diferentes superfícies de titânio.

2.2 Específicos

- Determinar se a quantidade total de proteínas salivares que interage com discos de titânio apresentando 4 tipos de preparo de superfície é diferenciada.
- Determinar se ocorrem interações entre a mucina glicoproteína - 2 (MG2) e discos de titânio apresentando 4 tipos de preparo de superfície.
- Determinar se ocorrem interações entre a lactoferrina e discos de titânio apresentando 4 tipos de preparo de superfície.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A maioria dos implantes é feita com titânio comercialmente puro ou ligas de titânio. A norma 67 da *American Society For Testing And Materials* (ASTMF-67) define comercialmente o grau de pureza do implante de acordo com a porcentagem máxima de oxigênio presente. Titânio grau 1 tem a maior pureza pois apresenta baixo percentual de oxigênio e titânio grau 4, tem um percentual mais elevado de oxigênio. A excelente resistência à corrosão do titânio e suas ligas está associada à presença de um filme de óxido de titânio (TiO_2) superficial (TEXTOR, 2001). Quando o titânio é exposto ao ar ou a um meio aquoso, uma camada de TiO_2 é espontaneamente formada sobre a sua superfície. Portanto, a interface osso-implante não será estabelecida diretamente através da superfície metálica do titânio, mas sim pela camada superficial de óxidos que protegem o meio biológico da influência tóxica da dissolução de elementos do substrato metálico (EISENBARTH *et al.*, 2002).

Estudos reportam que as superfícies do titânio são muito reativas (KASEMO; LAUSMAA, 1988; LAUSMAA, 1996). A camada de TiO_2 possui entre 2 e 5 nm de espessura e exibe características anfóteras que permitem trocas aniônicas e catiônicas. Adicionalmente, o titânio utilizado em implantodontia apresenta variedades inerentes à composição, tratamento de superfície e desenho geométrico. Existem relatos de que tratamentos superficiais melhoraram a capacidade de ancoragem do implante ao osso. Resultados favoráveis com a utilização dos implantes maquinados em processo de torneamento foram descritos, embora outros estudos sugeriram uma previsibilidade e osseointegração mais rápidas dos implantes com diferentes características superficiais (YAN *et al.*, 1997, SKRIPITIZ; ASPENBERG, 1998; NISHIGUCHI *et al.*, 1999).

A saliva humana, um fluido corporal essencial, contém componentes que participam na proteção dos tecidos moles e duros da cavidade oral contra irritações químicas, térmicas e mecânicas (SREEBNY, 2000). A saliva total é formada pela secreção das glândulas salivares maiores e menores assim como pelo fluido gengival, células epiteliais orais, bactérias, produtos bacterianos e restos alimentares (SCANNAPIECO, 1994). A superfície dos implantes é uma região

instável, possui elevada energia livre superficial e, a fim de se reduzir esse excesso de energia, átomos na superfície tendem a se ligar muito facilmente a espécies presentes nas interfaces (THULL, 2002).

Forças covalentes, iônicas ou pontes de hidrogênio podem contribuir no processo de adsorção de componentes salivares na interface entre óxidos de titânio e estas biomoléculas. O fenômeno de adsorção de proteínas na superfície dos implantes é motivado também pelo fato de que as proteínas geralmente possuem tanto grupamentos polares quanto apolares, favorecendo a uma concentração das mesmas numa interface que separa duas fases com características distintas: fluidos corpóreos (fase líquida) e implante (superfície hidrófoba) (THULL, 2002).

É importante destacar que mesmo aderidas à superfície dos implantes, as proteínas são capazes de manter sua biofuncionalidade. Assim sendo, estas superfícies revestidas por proteínas são potencialmente reconhecidas pelo organismo como parte do corpo e dessa forma, podem interagir com as entidades celulares e outros constituintes do sistema onde os implantes se encontram (MARQUES *et al.*, 2003).

Investigações sobre a adsorção de proteínas salivares têm sido conduzidas em diferentes tipos e modelos de superfície de titânio, particularmente sobre superfícies com características hidrofílicas e hidrofóbicas (STEINBERG, 1995, 1998). Existem relatos de que a amilase foi encontrada em películas adquiridas na superfície do esmalte (KILIAN *et al.*, 1990; LIU *et al.*, 2000) e de implantes de titânio (EDGERTON *et al.*, 1996; KOHAVI *et al.*, 1997). A imunoglobulina-A secretora (SIgA), produzida como resposta do hospedeiro a estímulos antigênicos, também foi encontrada na película adquirida formada sobre implantes (EDGERTON *et al.*, 1996). Mucina glicoproteína-1 (MG1) interage com microorganismos orais (VEERMAN *et al.*, 1995, REDDY, 1998), além de ser encontrada na película adquirida formada sobre implantes (EDGERTON *et al.*, 1996).

A superfície dos implantes contendo TiO_2 é modificada com a ligação covalente de proteínas as quais interagem com células de adesão ou de crescimento (STEINBERG *et al.*, 1995; SERRO *et al.*, 2000). As células apresentam receptores específicos localizados nas membranas para interagir e ligar-se com as proteínas, fenômeno denominado de biorreconhecimento. A formação da película é também a fase inicial do processo de adesão bacteriana e formação do biofilme, e

revestimentos que mostraram pronunciada inibição da adsorção de proteínas salivares, podem ser utilizados nas áreas supragengivais a fim de minimizar a adesão de microorganismos. A composição do biofilme é dependente da união primária entre bactérias pioneiras e a película adquirida (SARDIN *et al.*, 2004).

As características da película adquirida e dos microorganismos aderidos à mesma podem em parte explicar diferenças observadas na resposta tecidual ao redor dos dentes e de implantes de titânio, assim como em relação ao sucesso da osseointegração. As superfícies de titânio vem sendo modificadas não somente na sua estrutura química, mas também morfológicamente para estimularem processos metabólicos intracelulares e assim levarem a uma maior eficiência na adesão celular e regeneração tissular (QUYRINEN; BOLLEN, 1995; QUYRINEN *et al.*, 1993; HEYDENRIJK *et al.*, 2002; QUIRYNEN *et al.*, 1996).

Idealmente, a superfície do implante deve resistir à colonização bacteriana. Superfícies polidas permitem a formação do selamento epitelial o qual reduz o acúmulo de placa (ELTER *et al.*, 2008). Implantes orais, intermediários e cicatrizadores comercialmente disponíveis apresentam na superfície uma média de valores de irregularidades entre 0,2 e 2,5 microns. Enquanto uma rugosidade acima de 0,2 microns do transmucoso irá facilitar a formação do biofilme, um limiar abaixo de 0,2 microns não mostrou diferença significativa seja na quantidade total ou na patogenicidade das bactérias aderidas (BOLLEN *et al.*, 1996).

Acredita-se que a rápida osseointegração que ocorre com o titânio é devido à facilidade com que o fosfato de cálcio e proteínas diversas são adsorvidas sobre a superfície do mesmo (KOHAVI *et al.*, 1997; ELLINGSEN, 2000). O cálcio e a película salivar são adsorvidos na superfície e então bactérias orais podem aderir e colonizar as superfícies. Entretanto, a gengiva ao redor do dente natural e a mucosa que circunda um implante tem capacidade de prevenir a formação de biofilme subgengival e potencial para responder a um acúmulo de placa inicial. Na formação inicial do biofilme o epitélio juncional e um conjunto de fibras colágenas circulares estabelecem uma barreira que minimiza a entrada de microorganismos (ELTER *et al.*, 2008. APSE *et al.*, 1992).

Entretanto, usualmente a adesão de bactéria sobre superfícies sólidas ocorre e esta é dependente de muitos fatores incluindo energia livre de superfície, hidrofiliabilidade, carga superficial, rugosidade e presença de proteínas. Uma

significante correlação entre a energia livre de superfície de um biomaterial e a capacidade de retenção de placa tem sido estabelecida sendo que uma maior energia livre superficial favorece a aderência bacteriana (VAN DIJK *et al.*, 1987; MABBOUX *et al.*, 2004).

A adesão bacteriana nas superfícies dos implantes de titânio tem uma forte influência na cicatrização, e nos resultados clínicos dos mesmos tendo em vista que a inflamação da mucosa, e a destruição do osso periimplantar podem comprometer o sucesso do implante. Neste contexto, a análise quantitativa da formação do biofilme supragengival mostrou acúmulo de 5,7% em cicatrizadores com superfícies maquinadas e de 27,2% em superfícies com tratamento de superfície (ELTER *et al.*, 2008).

Um requisito para o sucesso dos implantes osseointegrados é a ausência de inflamação nos tecidos periimplantares (ELTER *et al.*, 2008; SCARANO *et al.*, 2004). Tendo em vista que a microbiota que cerca o implante dentário é similar o presente na dentição natural, existem relatos de que a ocorrência da perda óssea da crista é equivalente ao processo na doença periodontal (MOMBELLI *et al.*, 2000; RAMS *et al.*, 1991). Assim sendo, a formação de um biofilme sobre implantes expostos na cavidade oral é um fator de risco para a longevidade dos mesmos, pois microorganismos que colonizam o implante podem causar periimplantite dependendo da sua patogenicidade (YOSHINARI *et al.*, 2000).

Portanto, revestimentos biológicos podem ser utilizados para aumentar integração e promover a adsorção de proteínas salivares e bactérias específicas em regiões em contato com o tecido mole (LÄNGE *et al.*, 2004). Adicionalmente, embora problemas na cicatrização óssea dos implantes estejam bem estabelecidos, estudos adicionais são necessários para aumentar a compreensão sobre os componentes salivares adsorvidos na película biomolecular sobre as superfícies dos implantes.

REFERÊNCIAS

ADA COUNCIL ON SCIENTIFIC AFFAIRS. Titanium applications in dentistry. *Journal of the American Dental Association*, v.134, p. 347–349, 2003.

ALBREKTSSON, T. *et al.* The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v.1, n.1, p.11-25, 1986.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP). Parameter on aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, v.71, p.867-869, 2000(c).

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP). Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. *Journal of Periodontology*, v.71, p.853-855, 2000(a).

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP). Parameter on chronic periodontitis with advanced loss of periodontal support. *Journal of Periodontology*, v.71, p.856-858, 2000(b).

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *ASTM F67 - 06 Standard Specification for Unalloyed Titanium, for Surgical Implant Applications*. USA: ASTM, 2006.

APSE, P. *et al.* Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *Journal of Periodontal Research*, v.24, n.2, p.96-105, mar.1989.

BIESBROCK, A.R.; REDDY, M.S.; LEVINE, M.J. Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. *Infection and Immunity*, v.59, p.3492-3497, 1991.

BJURSTEN, L.M. *et al.* Method for ultrastructural studies of the intact tissue-metal interface. *Biomaterials*, v.11, n.8, p.596-601, Oct. 1990.

BOLLEN, C.M. *et al.* The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clinical Oral Implants Research*, v.7, n.3, p.201-211, Sept. 1996.

BRÅNEMARK, P.I. *et al.* Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, v.3, n.2, p.81-100, 1969.

BRÅNEMARK, P.I. *et al.* Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, v.16, Suppl., p.1-132, 1977.

COLLINS, L.M.; DAWES, C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. **Journal of Dental Research**, v.66, p.1300-1302, 1987.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Physiology of IgA and IgA deficiency. **Journal of Clinical Immunology**, v.21, p.303-309, 2001.

EDGERTON, M.; LO, S.E.; SCANNAPIECO, F.A. Experimental salivary pellicles formed on titanium surfaces mediate adhesion of streptococci. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.11, n.4, p.443-449, Jul./Aug. 1996.

EISENBARTH, E. *et al.* Interactions between cells and titanium surfaces. **Biomolecular Engineering**, v.19, n.2, p.243-249, Aug. 2002.

ELLINGSEN, J. E. On the properties of surface-modified titanium. In: ELLINGSEN, J. E. **Bone Engineering**. Toronto: J. E. Davies University of Toronto Press, 2000. p.183-189 p.

ELTER, C. *et al.* Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.23, n.2, p.327-334, Mar./Apr. 2008.

ERICSSON, I. *et al.* Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, v.3, n.3, p.99-103, 1992.

FINE, D.H.; FURGANG, D.; BEYDOUIN, F. Lactoferrin iron levels are reduced in saliva of patients with localized aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.73, p.624-630, 2002.

FISHER, S.J. *et al.* External radiolabelling of components of pellicle on human enamel and cementum. **Archives of Oral Biology**, v.32, p.509-517, 1987.

FLEMMIG, T.F. Periodontitis. **Annals of Periodontology**, v.4, p. 32, 1999.

FOX, F.C. Saliva composition and its importance in dental health. **Compendium Supplement**, v.13, p.457-460, 1989.

GÖTZ, H. E. *et al.* Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. **Biomaterials**, v.25, n.18, p.4057-4064, Aug. 2004.

GRÖSSNER-SCHREIBER, B. *et al.* Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. **Clinical Oral Implants Research**, v.12, n.6, p.543-551, Dec. 2001.

GURURAJA, T.L. *et al.* NMR analysis of human salivary mucin (MUC7) derived O-linked model glycopeptides: comparison of structural features and carbohydrate-peptide interactions. ***Journal of Peptide Research***, v.54, n.4, p.290-231, Oct. 1999.

JOKSTAD, A. *et al.* Quality of dental implants. ***International Dental Journal***, v.53, n.6, p.409-443, 2003.

KASEMO, B.; LAUSMAA, J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. ***The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants***, v.3, n.4, p.247-259, Winter 1988.

KILIAN, M.; NYVAD, B. Ability to bind salivary alpha-amylase discriminates certain viridans group streptococcal species. ***Journal of Clinical Microbiology***. v.28, n.11, p.2576-7, Nov. 1990.

KOHAVI, D. *et al.* Alpha-Amylase and salivary albumin adsorption onto titanium, enamel and dentin: an in vivo study. ***Biomaterials***, v.18, n.13, p.903-906, Jul. 1997.

LÄNGE, K *et al.* Investigation of initial pellicle formation on modified titanium dioxide (TiO₂) surfaces by reflectometric interference spectroscopy (RIfS) in a model system. ***Dent Mater***, v.20, n.9, p.814-22, 2004.

LAUSMAA, J. Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. ***Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena***, v. 81, p.343-361, 1996.

LIGTENBERG, A. J. *et al.* Influence of saliva on aggregation and adherence of *Streptococcus gordonii* HG 222. ***Infection and immunity***, v.60, n.9, p.3878-3884, Sept.1992

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. ***Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia oral***. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LIU, B. *et al.* Interaction of human salivary mucin MG2, its recombinant N-terminal region and a synthetic peptide with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. ***Journal of Periodontal Research***, v.37, p.416-424, 2002.

LIU, B. *et al.* The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral Streptococci and exhibits candidacidal activity. ***Biochemical Journal***, v.345, n.3, p.557-564, Feb. 2000.

MABBOUX, F. *et al.* Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials--an in vitro study. ***Colloids and surfaces. Biointerfaces B***, v.39, n.4, p.199-205, Dec. 2004.

MACDONALD, D.E. *et al.* Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. ***Biomaterials***. v.23, n.4, p.1269-1279, Feb. 2002.

MARQUES, P.A. et al. Mineralisation of two phosphate ceramics in HBSS: role of albumin. **Biomaterials**, v.24, n.3, p.451-460, Feb. 2003.

MOMBELLI, A. et al. Persistence patterns of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia/nigrescens, and Actinobacillus actinomycetemcomitans after mechanical therapy of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.71, n.1, p.14-21, Jan. 2000.

MOMBELLI, A.; BUSER, D.; LANG, N. P. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. **Oral Microbiology and Immunology**, v.3, n.3, p.113-120, Sept. 1988.

NAKAZATO, G. et al. In vivo plaque formation on implant materials. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.4, n.4, p.321-326, Winter 1989.

NAKOU, M. et al. Early microbial colonization of permucosal implants in edentulous patients. **Journal of Dental Research**, v.66, n.11, p.1654-1657, Nov. 1987.

NISHIGUCHI, S. et al. Osteoconductivity and bone-bonding strength of high- and low-viscous bioactive bone cements. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.48, n.3, p.265-276, 1999.

QUIRYNEN, M. 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**, v.72, n.9, p.1304-1309, Sept. 1993.

QUIRYNEN, M. et al. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.11, n.2, p.169-78, Mar./Apr.1996.

QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C. M. 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**, v.22, n.1, p.1-14, Jan. 1995.

QUIRYNEN, M.; LISTGARTEN, M. A. Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Brånemark. **Clinical Oral Implants Research**, v.1, n.1, p.8-12, Dec. 1990.

RAMS, T. E. et al. Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. **Journal de Parodontologie**, v.10, n.1, p.11-18, Feb. 1991.

REDDY, M. S. Binding of the pili of Pseudomonas aeruginosa to a low-molecular-weight mucin and neutral cystatin of human submandibular-sublingual saliva. **Current Microbiology**, v.37, n.6, p.395-402, Dec. 1998.

ROOS, J. et al. A qualitative and quantitative method for evaluating implant success: a 5-year retrospective analysis of the Brånemark implant. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.12, n.4, p.504-514, Jul-Aug. 1997.

SARDIN, S. et al. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.31, n.2, p.140-148, Feb. 2004.

SCANNAPIECO, F. A. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. **Critical Review Oral Biology and Medicine**, v.5, n.3-4, p.203-248, 1994.

SCARANO, A. et al. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. **Journal of Periodontology**, v.75, n.2, p.292-296, Feb. 2004.

SCHROEDER,, A.; POHLER, O.; SUTTER, F. Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer. **SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd**, v.86, n.7, p.713-727, Jul. 1976.

SERRO, A. P. et al. Calcium phosphate deposition on titanium surfaces in the presence of fibronectin. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.49, n.3, p.345-352, Mar. 2000.

SKRIPITZ, R.; ASPENBERG, P. Tensile bond between bone and titanium: a reappraisal of osseointegration. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v.69, n.3, p.315-319, Jun. 1998.

SOARES, R.V. et al. MG2 and lactoferrin form a heterotypic complex in salivary secretions. **Journal of Dental Research**, v.82, p.471-475, 2003.

SREEBNY, L. M. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *The International Dental Journal*, v.50, n.3, p.140-161, Jun. 2000.

SREEBNY, L.M. Salivary flow in health and disease. **Compendium Supplement**, v.13, p.461-469, 1989.

STEINBERG, D. et al. Adsorption of human salivary proteins to titanium powder. I. Adsorption of human salivary albumin. **Biomaterials**. v.16, n.17, p.1339-1343, Nov. 1995.

STINSON, M.W.; LEVINE, M. J. Modulation of intergeneric adhesion of oral bacteria by human saliva. **Critical Review Oral Biology and Medicine**, v.4, n.3-4, p.309-314, 1993.

TABAK, L. A. et al. Absorption of human salivary mucins to hydroxyapatite. **Archives of Oral Biology**, v.30, p.423-427, 1985.

TEXTOR, M. et al. Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys. In: BRUNETTE, D.M. et al. **Titanium in medicine**. Berlin-Heidelberg: Springer Edited, 2001. p.172-224.

- THULL, R. Physicochemical principles of tissue material interactions. ***Biomolecular Engineering***, v. 19, p.43-50, 2002.
- VAN DIJK, J. et al. Surface-free energy and bacterial adhesion: an in vivo study in beagle dogs. ***Journal of Clinical of Periodontology***, v.14, p.300-304, 1987.
- VEERMAN, E.C. et al. Binding of human high-molecular-weight salivary mucins (MG1) to Hemophilus parainfluenzae. ***Journal of Dental Research***, v.74, n.1, p.351-357, Jan. 1995.
- WEINBERG, E.D. Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential. ***Journal of Pharmacy and Pharmacology***, v. 53, p.1303-1310, 2001.
- WU-YUAN, C.D. Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. ***Journal of Oral Implantology***, v.21, n.3, p.207-213, 1995.
- YAN, W.Q. et al. Bonding of chemically treated titanium implants to bone. ***Journal of Biomedical Materials Research***, v.37, n.2, p.267-275, Nov. 1997.
- YOSHINARI, M. et al. Influence of surface modifications to titanium on oral bacterial adhesion in vitro. ***Journal of Biomedical Materials Research***, v.52, p.388-394, Nov. 2000.
- ZARB, G.A.; ALBERKTSSON, T. Criteria for determining clinical success with osseointegrated dental implants. ***Cahiers de Prothese***, n.71, p.19-26, Sept. 1990.
- ZÖLLER, G.O.; ZENTNER, A. Initial attachment of human gingival fibroblast-like cells in vitro to titanium surfaces pretreated with saliva and serum. ***Clinical Oral Implants Research***, v.7, n.4, p.311-315, Dec. 1996.

ARTIGO CIENTÍFICO

Interações entre Proteínas Salivares e Discos de Titânio

Francisco Mauro Girundi¹
Elton Gonçalves Zenóbio²
Rodrigo Villamarim Soares³

RESUMO

Implantes de titânio ao serem inseridos na cavidade oral interagem com os tecidos e fluidos presentes. As proteínas salivares apresentam especificidade de aderência à superfície dentária assim como a biomateriais e microorganismos. Adicionalmente, possuem propriedades antibacterianas, antimicóticas, fungicidas e antiinflamatórias. O objetivo deste estudo foi investigar interações entre proteínas salivares e discos de titânio que, de acordo com características superficiais, foram divididos em 4 grupos específicos (G-I discos polidos; G-II discos tratados com ácido; G-III discos tratados com ácido e jateados; G-IV discos tratados com ácido, jateados e revestidos). Os discos foram incubados com amostras de saliva de um único doador e as proteínas presentes nas amostras de saliva, assim como as que não interagiram com a superfície dos discos, foram quantificadas por meio de um espectrofotômetro. Adicionalmente, amostras foram submetidas à eletroforese, coradas por Coomassie blue ou transferidas eletroforeticamente para membranas de nitrocelulose expostas a anticorpos direcionados contra MG2 ou lactoferrina. Diferenças significativas na concentração total das proteínas entre os grupos ($p < 0,05$; ANOVA bifatorial; Teste de Fisher) foram observadas, resultado que revelou que a adsorção protéica a G-III e G-IV foi maior que a G-I e G-II. Bandas de proteínas salivares coradas por Coomassie-Blue indicaram a presença da lactoferrina, peroxidase, amilase e de PRPs nas superfícies dos discos de todos os grupos. Western blots revelaram que G-I apresentou a menor interação com a MG2 e lactoferrina, e em contraste, G-III a maior com a MG2 e G-IV a maior com a lactoferrina. Os resultados do presente estudo indicam que a adsorção de proteínas salivares aos discos de titânio com características superficiais distintas exibe variações. Conseqüentemente sugerem que o biofilme formado sobre as superfícies poderia apresentar diferenças quantitativas e qualitativas na microbiota presente, e assim sendo indicam que osseointegração e taxas de sucesso distintas poderiam ocorrer nos implantes de titânio com estes tratamentos superficiais.

Palavras Chave: *implantes de titânio, proteínas salivares, interações moleculares, especificidade, tratamentos de superfície, osseointegração*

¹ Mestrando em Implantodontia - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

² Doutor em Periodontia pela Universidade do Estado de São Paulo; Professor Adjunto de Periodontia - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

³ Doutor em Biologia Oral pela Boston University; Professor Adjunto de Periodontia - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

INTRODUÇÃO

Ao final dos anos 60 Branemark e colaboradores iniciaram o desenvolvimento de implantes que, para a função clínica, dependiam de uma ancoragem direta no osso, denominada então de osseointegração. Experimentos em animais indicaram claramente que a ancoragem direta do implante ao tecido ósseo seria possível desde que algumas diretrizes definidas fossem seguidas ⁽¹⁾ ⁽²⁾. Posteriormente, através de técnicas desenvolvidas para cortar cuidadosamente o osso não-descalcificado e o implante, a existência de contato direto entre ambos foi comprovada ⁽³⁾. O implante apresenta uma estabilidade mecânica primária, alcançada pela pressão de inserção e, a osseointegração foi definida como sendo o processo pelo qual a fixação rígida e clinicamente assintomática de materiais aloplásticos é realizada e mantida no osso em presença de cargas funcionais ⁽⁴⁾.

A American Society For Testing And Materials (ASTMF) define comercialmente o grau de pureza do implante de titânio de acordo com a porcentagem máxima de oxigênio presente. O titânio puro e as suas ligas são os materiais de escolha para os implantes, intermediários e cicatrizadores ⁽⁵⁾. Os fenômenos ocorridos na interface material-tecido imediatamente após sua inserção são de grande importância na obtenção de um desempenho favorável do biomaterial ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾. Neste contexto, a quantidade e qualidade da adesão de moléculas distintas sobre a superfície do implante, intermediário ou cicatrizador também são importantes para o sucesso clínico dos implantes e deve ser ressaltado que a cicatrização da ferida na interface implante-tecido mole ocorre na presença de sangue e saliva ⁽⁸⁾.

A saliva é um fluido que mantém a saúde oral e protege tecidos moles e duros da cavidade oral de irritações químicas, térmicas e mecânicas ⁽⁹⁾. Existem relatos de interações entre proteínas salivares e superfícies de titânio ⁽¹⁰⁾ ⁽⁷⁾. Particularmente que a amilase salivar, proteínas ricas em prolina, a imunoglobulina-A secretora (SIgA) e a mucina glicoproteína – 1 (MG1) são componentes da película adquirida formada sobre o titânio, e que essas proteínas permitiriam a ocorrência de interações específicas com determinados microorganismos ⁽¹⁰⁾.

Implantes saudáveis possuem microbiota subgengival semelhante a dos dentes naturais com saúde periodontal, entretanto exames mais detalhados da

microflora ao redor dos mesmos revelaram proporções distintas de bactérias ⁽¹¹⁾ ⁽¹²⁾ ⁽¹³⁾. As características da película adquirida formada sobre as superfícies dos implantes modulam quais microorganismos poderão se aderir à mesma, e esse fenômeno pode explicar diferenças observadas na resposta tecidual ao redor dos dentes e de implantes de titânio, assim como em relação ao sucesso da osseointegração ⁽¹⁴⁾. É importante destacar que o biofilme bacteriano sobre os implantes é fundamental na patogênese da doença periimplantar ⁽¹⁵⁾.

Assim sendo, a busca da melhor característica superficial do titânio para os implantes e componentes intermediários transmucosos tem sido objeto de investigação científica ⁽¹⁶⁾ ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾. Particularmente, a rugosidade superficial foi sugerida como sendo mais importante que a energia livre superficial na formação do biofilme sobre implantes de titânio ⁽¹⁶⁾ ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾. Estudos in vivo reportaram que a colonização bacteriana em superfícies rugosas de titânio é maior que em superfícies lisas ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁰⁾ e características superficiais dos materiais de implante influenciaram também na formação e quantidade do biofilme ⁽²¹⁾.

Os estudos descritos acima evidenciam que biomateriais têm diferentes propriedades químicas e energia livre superficial, que a adsorção dos componentes salivares a estes exibe especificidade e modula a formação de um biofilme sobre as superfícies presentes. Particularmente, que o titânio utilizado na implantodontia apresenta variedades inerentes à composição, desenho geométrico e tratamento da superfície. Portanto, o objetivo é ampliar o conhecimento das interações entre proteínas salivares e implantes de titânio, avaliar a quantidade total de interações assim como determinar componentes específicos que possam estar presentes na película adquirida formada sobre implantes com características distintas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Discos de Titânio

Trinta e seis discos de titânio estéreis, com as mesmas dimensões (diâmetro de 4.0mm e altura de 1.0mm) e peso (100mg), e apresentando 4 tipos de preparo de superfície foram utilizados no presente estudo. De acordo com as características da superfície dos discos, 4 grupos experimentais foram formados (nove discos em cada grupo). O grupo I (G-I) com discos de titânio polidos (usinados e com acabamento superficial polido), o grupo II (G-II) com discos de titânio tratados com ácido (usinados e submetidos a processo de subtração ácida), o grupo III (G-III) com discos de titânio tratados com ácido e jateados (usinados, jateados com partículas abrasivas e posteriormente submetidos ao processo de subtração ácida) e o grupo IV (G-IV) com discos de titânio tratados com ácido, jateados e revestidos (usinados, jateados com partículas abrasivas, submetidos a subtração ácida e revestidos com solução nanométrica). Os discos foram fornecidos pela Neodent (Neodent - ILAPEO; Curitiba, Paraná, Brasil) e um disco de cada grupo pode ser observado na Figura 1.

Coleta de Saliva

Com a finalidade de avaliar as interações entre proteínas salivares e os discos descritos acima, amostras de saliva foram coletadas. Para eliminar variações na composição e concentração das proteínas presentes, saliva das glândulas submandibulares e sublinguais (SMSL) foi coletada de um único indivíduo (gênero feminino; 27 anos). A doadora foi examinada para comprovar a ausência de periodontite (profundidade de sondagem < 4 mm em todos os sítios presentes). No dia da coleta foi solicitado que a doadora se abstinhasse de ingerir alimentos e bebidas nas duas horas que precederam a coleta. Amostras de SMSL foram obtidas mediante a estimulação com balas (sabor limão) e as mesmas foram coletadas através de um coletor individualizado⁽²²⁾. As amostras foram coletadas em tubos de 15 ml estéreis mantidos previamente e também durante o período da coleta em gelo. Foram centrifugadas (10.000 rpm por 10 min) e o material sobrenadante transferido

para um novo tubo e este em seguida foi aliquotado para utilização nos experimentos descritos abaixo.

Preparação dos discos

O protocolo descrito neste tópico e no próximo foi baseado em um relatado previamente ⁽¹⁰⁾. Discos de titânio foram equilibrados através de incubação (3 vezes por 5 min) em 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), contendo 154 mM NaCl (TBS). Posteriormente, cada disco foi incubado em 0,5 ml de SMSL em tubos eppendorf (1,5 ml) por duas horas, mediante agitação a temperatura ambiente.

Interações entre Proteínas Salivares e Implantes

Os tubos foram centrifugados (3000 rpm por 3 minutos), a saliva sobrenadante foi removida e separada para utilização nos experimentos de quantificação protéica ou envolvendo eletroforese. Os discos foram lavados duas vezes com adição de 1 ml de TBS para remoção de componentes salivares não adsorvidos. A película experimental foi removida das superfícies de titânio pela adição de 30 µl de uma solução com 0,064 mM Tris-HCl contendo, 2% SDS, 10% glicerol e 10% de 2-mercaptanoetanol (pH 6,8) que foi incubada a 100°C por 5 minutos.

Análise de Proteínas Totais

A concentração total de proteínas presentes nas amostras do sobrenadante de saliva estimulada foi calculada utilizando-se um espectrofotômetro (UV-1601, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) conforme descrito previamente ⁽²³⁾. Foram utilizados três discos de cada grupo. Resumidamente, um comprimento de onda de 215 nm foi utilizado e o cálculo da concentração considera que um coeficiente de absorção de valor 15 equivale a uma concentração de 1 mg/mL para uma solução analisada em uma cuvette de 1 cm.

Eletroforese Vertical

Amostras de saliva fresca (50 µl) e de sobrenadantes salivares contendo proteínas que não interagiram com os discos de titânio (50 µl) foram liofilizadas. Estas amostras e as derivadas dos componentes da película experimental, foram submetidas à eletroforese em géis de separação (7,5 % SDS-PAGE), preparados com tampão Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) contendo SDS (0,1%), 50 µl de persulfato de amônio (100 mg/ml), 2,5 ml de uma solução de bis/acrilamida (1:37,5) 30% em água e 5 µl de TEMED, em um volume final de 10 ml. Após a polimerização dos géis de separação foram preparados os géis superiores (5 % SDS-PAGE) em tampão Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) contendo SDS (0,1%), 1,67 ml de bis-acrilamida (30%), 50 µl de persulfato de amônio (100 mg/ml) e 10 µl de TEMED, em um volume final de 10 ml. As corridas de eletroforese foram realizadas em tampão Tris-HCl 0,025 M contendo glicina 0,18 M; pH 8,3 e SDS (1%) por aproximadamente 2 horas, a temperatura ambiente, em corrente de 80 V. Foram utilizados quatro discos de cada grupo.

Análise das bandas de proteínas salivares

Após a corrida de eletroforese, géis de poli(acrilamida) foram corados por meio de Coomassie-Blue R-250 (0,25%) em solução de metanol (45%), água (45%) e ácido acético (10%) por 30 minutos, à temperatura ambiente. A remoção do excesso de corante foi obtida com uma solução de metanol (10%), ácido acético (5%) e água (85%), até que o aparecimento das bandas proteicas. Posteriormente os géis foram mantidos em ácido acético (7,5%).

Transferência de Proteínas e Western Blot

As proteínas salivares foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose (Protran, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Foram utilizados dois discos de cada grupo. As transferências foram realizadas em tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,19 M e metanol (20%), a 100 V, por 1 hora e a temperatura ambiente. As proteínas salivares imobilizadas foram

incubadas em Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), contendo NaCl 150 mM e 0,05% de Tween 20 (TBST) por 5 minutos e bloqueadas em TBST contendo 5% de leite, a temperatura ambiente, por 1 hora. As membranas foram lavadas em TBST (3 vezes por 10min) e incubadas com anticorpos primários (produzidos em coelhos) direcionados contra MG2 ou lactoferrina, diluídos respectivamente 1:1000 e 1:2000 em TBST contendo 1% de leite, a temperatura ambiente, por 1 hora. As membranas foram lavadas em TBST (3 vezes por 10min) e incubadas com anticorpos secundários (produzidos em caprinos; Promega, Madison, WI, USA) direcionadas contra as imunoglobulinas G de coelhos e conjugados com a fosfatase alcalina, diluídos 1:7500 em TBST contendo 1% de leite, a temperatura ambiente, por 1 hora. As membranas foram lavadas em TBST (3 vezes por 10min) e incubadas com BCIP e NBT de acordo com as instruções do fabricante (Promega).

Análise Estatística

Os resultados da quantificação protéica foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA bifatorial), Teste de Fisher ao nível de 5% de significância. A análise foi realizada utilizando-se o programa estatístico StatView 4.5 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, Califórnia, USA).

RESULTADOS

Quantificação Proteica

A concentração total das proteínas presentes na SMSL da doadora foi de 2,45 mg/ml. A análise da concentração nos sobrenadantes que ficaram em contato com os discos de titânio revelou que quantidades diferenciadas de proteínas estavam presentes (Tabela 1). A análise estatística encontrou diferenças significativas entre os grupos. O sobrenadante exposto a G-I apresentava valores superiores a G-III ($p=0,001$) e G-IV ($p=0,005$), assim como o sobrenadante exposto a G-II apresentava valores superiores a G-III ($p=0,027$) e G-IV ($p=0,0004$). Diferenças na concentração dos sobrenadantes de G-I e G-II ($p=0,07$), e de G-III e G-IV ($p=0,31$) não foram

observadas. Estes resultados evidenciam que a adsorção protéica em G-III e G-IV foi maior que em G-I e G-II.

Análise por meio do Coomassie-Blue

Um padrão similar de bandas de proteínas salivares com peso molecular próximo ou inferior a 80 kDa pode ser observado na Figura 2. Baseando-se em um estudo prévio (Becerra *et al.* 2003), a mobilidade eletroforética das bandas presentes indicam a possível presença da lactoferrina e/ou peroxidase, amilase e de proteínas ricas em prolina (PRPs) na SMSL pura (Figura 2; faixa 1), nos sobrenadantes contendo proteínas que não interagiram com os discos (Figura 2; faixas 2, 4, 6 e 8) e nas amostras que interagiram com os mesmos (Figura 2; faixas 3, 5, 7 e 9).

Análise através do Western blot de interações com MG2 e lactoferrina

O uso de anticorpos específicos direcionados contra a mucina glicoproteína – 2 (MG2) e lactoferrina evidenciou a presença destas glicoproteínas nos diferentes discos de titânio (Figuras 3 e 4). Em relação à MG2, nota-se que G-I apresentou a menor interação (Figura 3; faixa 2) com esta mucina salivar e em contraste G-III apresentou a maior (Figura 3; faixa 6). Um resultado similar foi encontrado para a lactoferrina tendo em vista que G-I novamente exibiu a menor quantidade de lactoferrina adsorvida (Figura 4; faixa 2) e G-IV a maior (Figura 4; faixa 8).

DISCUSSÃO

Titânio e suas ligas são usados em implantodontia por suas importantes características, tais como: inércia química, resistência mecânica, baixa densidade, ausência de toxicidade e biocompatibilidade ⁽²⁴⁾. A resistência à corrosão, biocompatibilidade e a osseointegração do titânio resultam principalmente das características superficiais do mesmo e alterações nas suas propriedades físico-químicas que podem modular a adsorção de proteínas e posteriormente a união celular ⁽²⁵⁾. Neste contexto, implantes em contato com líquidos corporais exibirão

alterações de suas propriedades devido a interações iônicas, moleculares e celulares⁽²⁶⁾.

A adsorção seletiva de proteínas salivares na superfície dos biomateriais determina a formação do biofilme⁽¹⁴⁾. Estudos prévios relataram que uma camada de película adsorvida sobre esmalte é detectável inicialmente após 1 minuto de exposição no meio oral⁽²⁷⁾ e que a formação da película atinge equilíbrio entre adsorção e desadsorção das proteínas em 2 horas^{(28) (29)}.

O presente estudo quantificou a adsorção de proteínas salivares em quatro superfícies de titânio possuindo características superficiais distintas. Os sobrenadantes contendo proteínas salivares que não interagiram com G-I e com G-II apresentaram concentrações proteicas significativamente superiores a G-III e G-IV (Tabela 1). Estes resultados evidenciam que a adsorção proteica a discos usinados, jateados com partículas abrasivas e posteriormente submetidos ao processo de subtração ácida (G-III), assim como a discos com este tratamento além da adição de um revestimento com partículas nanométricas (G-IV) é superior a observada em discos usinados e com acabamento superficial polido (G-I) e aos usinados e submetidos a processo de subtração ácida (G-II), e estão em acordo com estudos prévios que relataram que a rugosidade e composição química superficial são fatores determinantes para a maior deposição proteica^{(30) (31)}.

A análise por meio do Coomassie-blue indica a presença de lactoferrina e/ou peroxidase, amilase e PRPs nas superfícies dos discos avaliados (Figura 2). Tendo em vista que o peso molecular da lactoferrina e da peroxidase é similar, a análise com este corante não permite determinar se a banda visualizada é derivada uma ou de ambas as proteínas. A presença da amilase e PRPs encontrada neste estudo é descrita em um anterior⁽¹⁰⁾, entretanto o mesmo estudo relata que a MG1 e a SIgA também estariam presentes na película formada sobre o titânio. A não visualização destas glicoproteínas pode em parte ser explicada pela grande quantidade de carboidratos presentes nas mesmas, particularmente na mucina, assim como pelos tratamentos superficiais presentes nos discos avaliados no presente estudo que não foi conduzido no prévio (foram utilizadas esferas de titânio sem tratamento superficial).

A possível presença da MG2 e da lactoferrina nas películas formadas sobre as superfícies distintas foi avaliada em experimentos de Western blot. A

especificidade destes anticorpos foi demonstrada previamente ^{(32) (33) (34)} e neste presente estudo, diferenças na intensidade de bandas imunoreativas das duas glicoproteínas foram observadas (Figura 3; Figura 4).

A MG2 foi observada em todas as superfícies analisadas, entretanto nota-se uma maior interação desta mucina salivar com o G-III e G-IV, mais uma vez indicando que uma maior quantidade de tratamentos superficiais favorece a adsorção proteica (Figura 3). A presença da MG2 não foi detectada no estudo citado anteriormente ⁽¹⁰⁾, entretanto os autores não utilizaram anticorpos para detectar a mesma e como mencionado acima, utilizaram titânio com características distintas. Tendo em vista que a MG2 pode aglutinar um número variado de espécies bacterianas ^{(35) (36) (37) (38) (39)}, possui atividade fungicida ^{(40) (39)} e bactericida ⁽³⁹⁾, sua presença nestas superfícies pode em princípio aumentar a atividade do sistema imune inato nas mesmas.

A lactoferrina também foi detectada em todas as superfícies analisadas (Figura 4), a banda proveniente de lactoferrina que foi removida de G-IV foi a mais intensa e a de G-I a menos intensa, o que confirma mais uma vez a maior interação entre componentes salivares e superfícies de titânio com tratamentos superficiais variados (G-IV). Assim como a MG2, a lactoferrina exibe propriedades importantes na cavidade oral tais como atividade antibacteriana, antimicótica, antiviral e atividade antiinflamatória ⁽⁴¹⁾. Recentemente, foi identificado um complexo entre lactoferrina e MG2 na saliva, e os autores sugeriram que esse complexo poderia aumentar a atividade antimicrobiana em sítios específicos da cavidade oral ⁽³³⁾.

Sabe-se que as irregularidades de superfície são suavizadas por proteínas adsorvidas ⁽⁴²⁾ e que existe uma correlação positiva entre rugosidade e adesão bacteriana superficial. ^{(43) (44) (45) (46) (18) (47) (20) (48)}. Entretanto, apesar dos componentes da película promoverem sítios para ligação de bactérias ao substrato, mudanças superficiais provocadas pela película podem também dificultar a aderência bacteriana ⁽¹⁰⁾. Neste contexto, Wu-Yuan *et al.* ⁽²¹⁾, mostraram que superfícies de titânio não cobertas por saliva fornecem melhor aderência para as espécies bacterianas independente da rugosidade superficial.

Steinberg *et al.* ⁽¹⁴⁾ mostraram que periodontopatógenos como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* são capazes de aderir nas superfícies polidas de titânio. Um resultado similar foi encontrado por Yoshinari *et*

al. ⁽¹⁵⁾ comparando a aderência de bactérias orais sobre superfícies tratadas e polidas mostraram que maior quantidade de *P. gingivalis* e *A. actinomicetemcomitans* estava aderida sobre o titânio polido.

O presente estudo encontrou variações na quantidade total de proteínas adsorvidas às superfícies de titânio avaliadas, assim como observou especificamente que quantidades diferenciadas de duas importantes glicoproteínas salivares interagiram com estas superfícies. A diferença na adesão de proteínas salivares a biomateriais modula a composição da película adquirida formada sobre estes e conseqüentemente, provoca uma adesão diferenciada de microorganismos. Tendo em vista que o uso dos implantes odontológicos, assim como a oferta dos mesmos, com diferentes tratamentos de superfície vem aumentando significativamente na odontologia, e que o sucesso dos mesmos está relacionado ao biofilme presente, a avaliação criteriosa dos possíveis benefícios associados aos implantes de titânio com diferentes características deve ser objeto de investigação de estudos adicionais.

REFERÊNCIAS

- (01) Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scand J Plast Reconstr Surg.**, 1969; 3(2):81-100.
- (02) Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand J Plast Reconstr Surg**, 1977; 16:1-132.
- (03) Schroeder, A, Pohler O, Sutter F. Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer. **SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd.** 1976; 86(7):713-27.
- (04) Zarb GA, Alberktsson T. Criteria for determining clinical success with osseointegrated dental implants. **Cah Prothese.**, 1990; (71):19-26.
- (05) ADA Council on Scientific Affairs. Titanium applications in dentistry. **J. Am. Dent. Assoc.** 2003; 134:347–349.
- (06) Thull, R. Physicochemical principles of tissue material interactions. **Biomol. Engin.**, 2002; 19:43-50.
- (07) Kohavi D, Klinger A, Steinberg D, Mann E, Sela NM. Alpha-Amylase and salivary albumin adsorption onto titanium, enamel and dentin: an in vivo study. **Biomaterials**, 1997; 18(13):903-906.
- (08) Zöller GO, Zentner A. Initial attachment of human gingival fibroblast-like cells in vitro to titanium surfaces pretreated with saliva and serum. **Clin Oral Implants Res.**, 1996; 7(4):311-5.
- (09) Sreebny, LM. Salivary flow in health and disease. *Compendium Supplement*, 1989; 13:461-469.
- (10) Edgerton M, Lo SE, Scannapieco FA. Experimental salivary pellicles formed on titanium surfaces mediate adhesion of streptococci. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 1996; 11(4):443-449.
- (11) Nakou M, Mikx FH, Oosterwaal PJ, Kruijssen JC. Early microbial colonization of permucosal implants in edentulous patients. **J Dent Res.**, 1987; 66(11):1654-7.
- (12) Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. **J Periodontal Res.**, 1989, 24(2):96-105, 1989.
- (13) Mombelli A, Buser D, Lang NP. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. **Oral Microbiol Immunol.**, 1998, 3(3):113-20.

- (14) Steinberg D, Klinger A, Kohavi D, Sela MN. Adsorption of human salivary proteins to titanium powder. I. Adsorption of human salivary albumin. **Biomaterials**, 1995; 16(17):1339-43.
- (15) 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; 52:388-394.
- (16) Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, Yamauchi M. In vivo plaque formation on implant materials. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, 1989; 4(4):321-6.
- (17) Quirynen M, Listgarten MA. Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Brånemark. **Clin Oral Implants Res.**, 1990; 1(1):8-12.
- (18) Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, Naert I, Busscher HJ, van Steenberghe D. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. **J Dent Res.**, 1993; 72(9):1304-9.
- (19) Bollen CM, Papaioanno W, Van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. **Clin Oral Implants Res.**, 1996; 7(3):201-11.
- (20) Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, 1996; 11(2):169-78.
- (21) Wu-Yuan CD, Eganhouse KJ, Keller JC, Walters KS. Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. **J Oral Implantol.**, 1995; 21(3):207-13.
- (22) Jensen, JL, Lamkin, MS, Oppenheim FG. Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. **J Dent Res.**, 1992; 71(9):1569-76.
- (23) Rayment SA, Liu B, Soares RV, Offner GD, Oppenheim FG, Troxler RF. The effects of duration and intensity of stimulation on total protein and mucin concentrations in resting and stimulated whole saliva. **J Dent Res.**, 2001; 80(6):1584-7.
- (24) B. Grosogeat, L. Reclaru, M. Lissac, F. Dalard, Measurement and evaluation of galvanic corrosion between titanium/Ti6Al4V implants and dental alloys by electrochemical techniques and auger spectrometry. **Biomaterials**, 1999: 933–941

- (25) MacDonald DE, Deo N, Markovic B, Stranick M, Somasundaran P. Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. **Biomaterials**, 2002; 23(4):1269-79.
- (26) Ellingsen JE. On the properties of surface-modified titanium. In: JE Ellingsen, **Bone Engineering**. Toronto: J. E. Davies University of Toronto Press, 2000. p.183-189.
- (27) Hannig M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. **Clin Oral Investig.**, 1999; 3(2):88-95.
- (28) Sönju T, Rölla G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. **Caries Res.**, 1973; 7(1):30-8.
- (29) Kuboki Y, Teraoka K, Okada S. X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel. **J Dent Res.**, 1987; 66(5):1016-9.
- (30) Playford RJ, Macdonald CE. Growth factors in saliva. **Lancet.**, 1997; Aug 2;350(9074):369.
- (31) Länge K, Herold M, Scheideler L, Geis-Gerstorfer J, Wendel HP, Gauglitz G. Investigation of initial pellicle formation on modified titanium dioxide (TiO₂) surfaces by reflectometric interference spectroscopy (RIfS) in a model system. **Dent Mater.**, 2004; 20(9):814-22.
- (32) Soares RV, Liu B, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. Structural characterisation of cysteines in a bacterial-binding motif of human salivary mucin MG2. **Arch Oral Biol.** 2002; 47(8):591-7.
- (33) Soares RV, Siqueira CC, Bruno LS, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. MG2 and lactoferrin form a heterotypic complex in salivary secretions. **J Dental Res.**, 2003; 82:471-5.
- (34) Soares RV, Lin T, Siqueira CC, Bruno LS, Li X, Oppenheim FG, Offner G, Troxler RF. Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. **Arch Oral Biol.** 2004; 49(5):337-43.
- (35) Biesbrock, A.R.; Reddy, M.S.; Levine, M.J. Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. **Infect. immun.**, 1991; 59:3492-3497.
- (36) Ligtenberg AJ, Walgreen-Weterings E, Veerman EC, De Soet JJ, De Graaff J, Amerongen AV. Influence of saliva on aggregation and adherence of *Streptococcus gordonii* HG 222. **Infect Immun.**, 1992; 60(9):3878-3884.

- (37) Stinson MW, Levine MJ. Modulation of intergeneric adhesion of oral bacteria by human saliva. **Crit Rev Oral Biol Med.**, 1993; 4(3-4):309-14.
- (38) Liu B, Rayment S, Oppenheim FG, Troxler RF. Isolation of human salivary mucin MG2 by a novel method and characterization of its interactions with oral bacteria. **Arch Biochem Biophys.** 1999 Apr 15;364(2):286-93.
- (39) Liu B, Rayment SA, Gyurko C, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral Streptococci and exhibits candidacidal activity. **Biochem J.**, 2000; 345(3):557-64.
- (40) Gururaja TL, Satyanarayana J, Levine MJ, Naganagowda GA. NMR analysis of human salivary mucin (MUC7) derived O-linked model glycopeptides: comparison of structural features and carbohydrate-peptide interactions. **J Pept Res.**, 1999, 54(4):290-31.
- (41) Weinberg ED. Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential. **J Pharm Pharmacol**, 2001; 53:1303-1310.
- (42) Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M, Geis-Gerstorfer J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. **J Biomed Mater Res A.**, 2006; 76(2):323-34.
- (43) Gatewood RR, Cobb CM, Killoy WJ. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. **Clin Oral Implants Res.** 1993 Jun;4(2):53-64.
- (44) Drake DR, Paul J, Keller JC. Primary bacterial colonization of implant surfaces. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1999; 14(2):226-32.
- (45) Rimondini L, Farè S, Brambilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, Carrassi A. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. **J Periodontol.** 1997 Jun;68(6):556-62.
- (46) Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. **J Clin Periodontol.**, 1995; 22(1):1-14.
- (47) Heydenrijk K, Raghoobar GM, Meijer HJ, Van Der Reijden WA, Van Winkelhoff AJ, Stegenga B. Two-part implants inserted in a one-stage or a two-stage procedure. A prospective comparative study. **J Clin Periodontol.** 2002; 29(10):901-9.
- (48) Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. **Clin Oral Implants Res.** 2002; 13(1):1-19.

Legendas das Figuras

Figura 1 - Discos de Titânio. A- Disco liso; B- Disco tratado com ácido; C- Disco tratado com ácido e jateado; D- Disco tratado com ácido, jateado e revestido.

Figura 2 – Padrão Protéico nos Sobrenadantes e Discos. Gel de poliacrilamida corado por Coomassie Blue. 1- SMSL; 2- Adsorvido G-I; 3- Sobrenadante G-I; 4- Adsorvido G-II; 5- Sobrenadante G-II; 6- Adsorvido G-III; 7- Sobrenadante G-III; 8- Adsorvido G-IV; 9- Sobrenadante G-IV; L/P- lactoferrina/peroxidase; Am- amilase; PRPs- proteínas ricas em prolina

Figura 3 – Interações entre MG2 e Discos de Titânio. Western blot exposto ao anti-MG2. 1- Adsorvido G-I; 2- Sobrenadante G-I; 3- Adsorvido G-II; 4- Sobrenadante G-II; 5- Adsorvido G-III; 6- Sobrenadante G-III; 7- Adsorvido G-IV; 8- Sobrenadante G-IV

Figura 4 – Interações entre Lactoferrina e Discos de Titânio. Western blot exposto ao anti-lactoferrina. 1- Adsorvido G-I; 2- Sobrenadante G-I; 3- Adsorvido G-II; 4- Sobrenadante G-II; 5- Adsorvido G-III; 6- Sobrenadante G-III; 7- Adsorvido G-IV; 8- Sobrenadante G-IV

Tabela 1. Quantificação Proteica nos Sobrenadantes

Discos de Titânio	Concentração Proteica*(dp)
GI	228,0 (6,06)
GII	219,9 (4,10)
GIII	202,7 (7,07)
GIV	196,9 (8,04)

* Valores expressos em mg% (mg/100ml); dp – desvio padrão; ANOVA (Fisher post-hoc): G-I/G-II ($p=0,07$); G-I/G-III ($p=0,001$); G-I/G-IV ($p=0,005$); G-II/G-III ($p=0,027$); G-II/G-IV ($p=0,0004$); G-III/G-IV ($p=0,31$).

Figura 1. Discos de Titânio

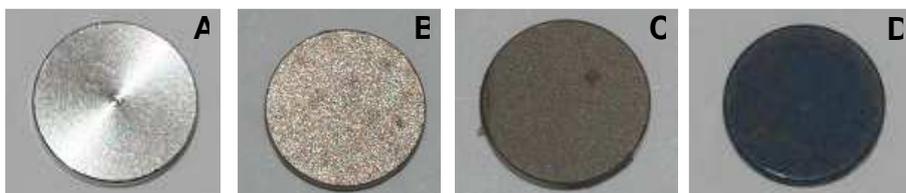


Figura 2 – Padrão Protéico nos Sobrenadantes e Discos

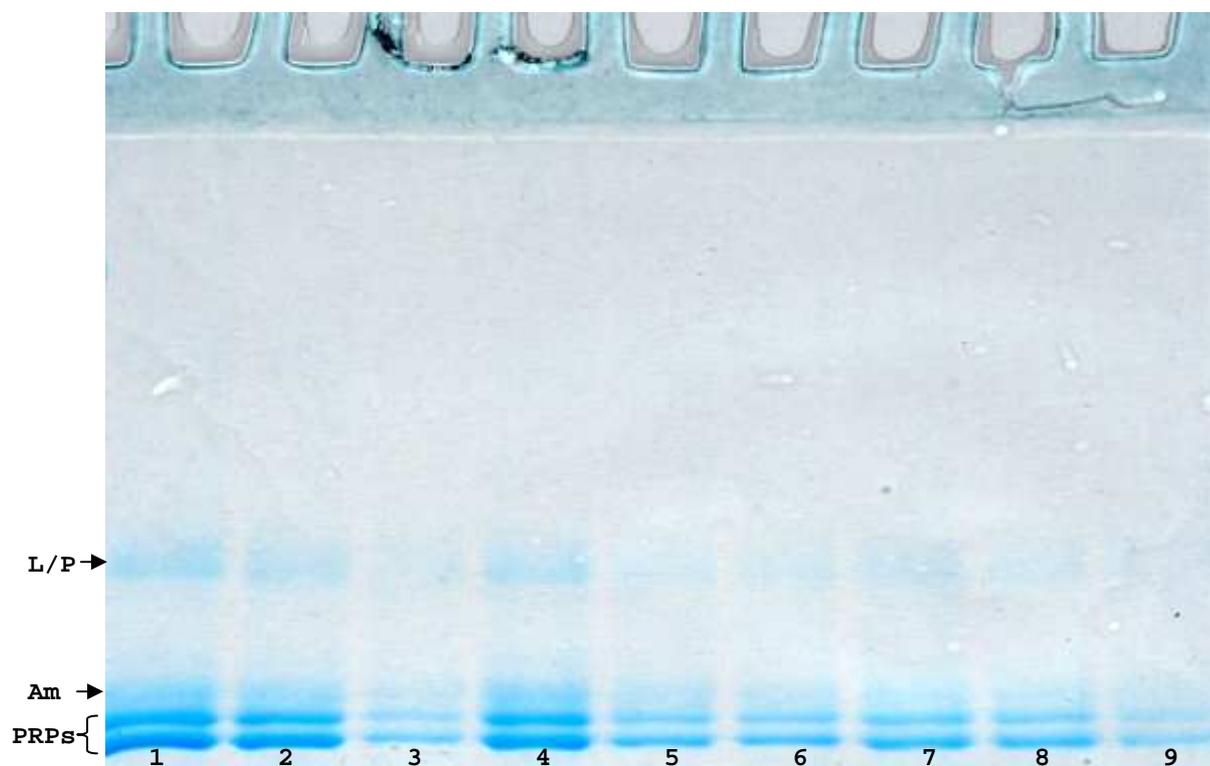


Figura 3 – Interações entre MG2 e Discos de Titânio

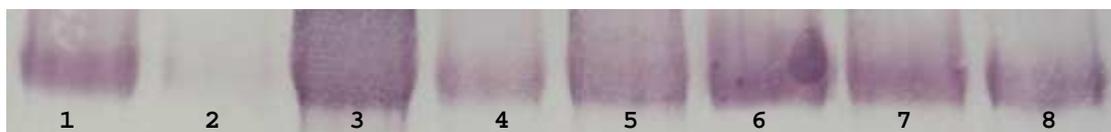


Figura 4 – Interações entre lactoferrina e Discos de Titânio



ANEXOS

Anexo 1. Coletor de saliva

Anexo 2. Coletor individualizado posicionado

Anexo 3. Coleta de amostras de saliva

Anexo 4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 1. Preparo do coletor de saliva

Anexo 2. Coletor individualizado posicionado



*A individualização é feita com a adição de Impregum F (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)

Anexo 2. Coleta de amostras de saliva

Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

N.º Registro CEP: CAAE 0126.0.213.000-08

Título do Projeto: Interações entre Proteínas Salivares e Discos de Titânio

Este termo de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente.

1) Introdução

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa sobre a diferença da saliva nas pessoas com e sem problemas na gengiva. Você foi selecionado(a) porque queremos examinar a sua saliva. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição, PUCMINAS .

É preciso entender a natureza e os riscos da sua participação e dar o seu consentimento livre e esclarecido por escrito.

2) Objetivo

O objetivo deste estudo é avaliar se a saliva interage com o titânio (um material usado na odontologia).

3) Procedimentos do Estudo

Se concordar em participar deste estudo você será solicitado doar uma pequena quantidade de saliva (5 ml) no período da manhã, entre 10:00 e 11:00 horas. Será necessário que você não coma ou beba (refrigerantes, sucos e outras bebidas) nas duas horas antes da coleta. Você pode beber água normalmente. Você vai enxaguar a boca com água, vai mastigar um pequeno pedaço de plástico (macio) e vamos coletar a sua saliva. Vamos guardar a sua saliva em tubos.

4) Riscos e desconfortos

Nesta pesquisa não existem riscos adicionais ao exame feito pelo dentista.

5) Benefícios

- ✓ A participação na pesquisa não acarretará em gasto para você. O conhecimento que você adquirir a partir da sua participação na pesquisa poderá beneficiá-lo com informações e orientações futuras em relação ao seu problema/tratamento/situação de vida, especialmente em relação à modificação de hábitos de vida, alimentação, trabalho e um melhor conhecimento dos fatores de risco sobre o tema, beneficiando-o de forma direta ou indireta.

- ✓ O tratamento poderá ou não trazer benefícios a você especificamente, mas as informações obtidas por meio do estudo poderão ser importantes para a descoberta de novos tratamentos/técnicas/tecnologia, capazes de diminuir os problemas existentes na população.
- ✓ As consultas, os procedimentos relacionados ao estudo e a terapêutica utilizada serão inteiramente gratuitos.
- ✓ Se diagnosticado algum problema, este será tratado e/ou encaminhado para tratamento apropriado nas clínicas desta instituição.

6) Tratamento Alternativo (se for o caso)

Não se aplica neste estudo.

Se você decidir não participar deste estudo, receberá o tratamento padrão para o seu problema/doença ou necessidade, de acordo com as normas desta instituição.

7) Custos/Reembolso

Você não terá nenhum gasto com a sua participação no estudo. A medicação (se necessária), as consultas, os exames e todo tratamento serão gratuitos e também não receberá pagamento pela sua participação. Você não receberá cobrança por nenhum tratamento, exame adicional ou qualquer outro procedimento feito durante o estudo.

8) Caráter Confidencial dos Registros

Algumas informações obtidas a partir de sua participação neste estudo não poderão ser mantidas estritamente confidenciais. Além dos profissionais de saúde que estarão cuidando de você, agências governamentais locais e o Comitê de Ética em Pesquisa da instituição onde o estudo está sendo realizado podem precisar consultar seus registros. Você não será identificado quando o material de seu registro for utilizado, seja para propósitos de publicação científica ou educativa. Ao assinar este consentimento informado, você autoriza as inspeções em seus registros, que será realizada na presença do pesquisador responsável e somente a pedido dos órgãos citados acima.

9) Participação

Sua participação nesta pesquisa consistirá em ser examinado por um dentista e doar uma pequena quantidade de saliva. É importante que você esteja consciente de que a participação neste estudo de pesquisa é completamente voluntária e de que você pode recusar-se a participar ou sair do estudo a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tenha direito de outra forma. Em caso de você decidir retirar-se do estudo, deverá notificar ao profissional e/ou pesquisador que esteja atendendo-o. A recusa em participar ou a saída do estudo não influenciarão seus cuidados nesta instituição.

10) Para obter informações adicionais

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Caso você tenha mais dúvidas sobre o estudo, por favor, ligue para a PUCMINAS, faculdade de Odontologia, Programa de Mestrado em Clínicas Odontológicas.

Avenida Dom José Gaspar, 500 – Prédio 46, Coração Eucarístico, Belo Horizonte, MG- Brasil Cep. 30535-610
Telefone (31) 3319-4414; Fax (31) 3319-4415

E-mail: mestodonto@pucminas.br

Professor Rodrigo Villamarim Soares

Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, você também poderá contatar o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, no telefone (31) 3319-4517.

12) Declaração de consentimento

Li, ou alguém leu para mim, as informações contidas neste documento antes de assinar este termo de consentimento. Declaro que fui informado sobre os métodos do estudo a ser utilizado, das inconveniências, dos riscos, dos benefícios e dos eventos adversos que podem vir a ocorrer em consequência dos procedimentos.

Declaro que tive tempo suficiente para ler e entender as informações acima. Declaro também que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Confirmando também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo em qualquer momento, sem perda de benefícios ou qualquer outra penalidade.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade e sem reservas para participar como paciente deste estudo.

Nome do participante (em letra de forma)

Assinatura do participante ou representante legal

Data

Atesto que expliquei cuidadosamente a natureza e o objetivo deste estudo, os possíveis riscos e benefícios da participação no mesmo, junto ao participante e/ou seu representante autorizado. Acredito que o participante e/ou seu representante recebeu todas as informações necessárias, que foram fornecidas em uma linguagem adequada e compreensível e que ele/ela compreendeu essa explicação.

Assinatura do pesquisador

Data

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)