

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO - UNISA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
AREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA

THIAGO CONTI NEMER

INFLUÊNCIA DA NANOTOPOGRAFIA DE TITÂNIO SOBRE A EXPRESSÃO DE
MARCADORES OSTEOGÊNICOS EM RATOS

SÃO PAULO-SP
2013

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO - UNISA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
AREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA

THIAGO CONTI NEMER

Influência da nanotopografia de titânio sobre a expressão de marcadores
osteogênicos em ratos

“Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Odontologia concentração em Implantodontia do programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Santo Amaro”.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho

Co-orientador: Prof. Dr. William Cunha Brandt

SÃO PAULO-SP

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente ao meu Senhor Jesus Cristo que me da força e me capacita no meu caminhar me ajudando a fazer todas as coisas com excelência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente e a todos as pessoas que me apoiaram de alguma forma, na realização deste sonho.

A minha querida esposa Juliana pelo apoio, carinho, amor, dedicação durante toda esta jornada, tornando este processo da minha vida muito mais fácil e agradável.

Aos meus pais Luiz e Marta que me criaram, educaram, me deram todo carinho e amor, me ensinando os valores da vida e me ensinando o caminho correto.

Ao meu amigo Leandro pela ajuda, amizade e por sempre estar presente.

Ao meu professor e coordenador do curso, Professor Doutor Wilson Sendyk pelo apoio, amizade, ensino e por me proporcionar a honra e oportunidade de ser mestrando neste curso internacionalmente reconhecido.

Ao meu orientador Professor Doutor Humberto Osvaldo Schwartz Filho pelo apoio, compreensão, dedicação, auxílio, amizade, paciência. Muito obrigado.

Aos professores do curso de mestrado da Universidade de Santo Amaro – UNISA, Prof. Dr. William Cunha Brandt, Dra. Angélica Castro Pimentel, Dra. Debora Pallos, Dr. Caio V. G. Roman, Dra. Karina Cogo, pela ajuda durante a realização desse trabalho.

Aos meus amigos do curso de mestrado Joel e Guilherme. Cada um teve uma grande participação no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus familiares, amigos e pacientes que tantas vezes souberam entender a minha ausência, e falta de paciência.

A todos que acreditaram em mim no transcorrer deste curso e conclusão deste trabalho.

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3. PROPOSIÇÃO	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5. RESULTADOS.....	32
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÃO	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXO 1	46

RESUMO

A osseointegração sobre superfícies de titânio tem sido extensamente investigada, entretanto, não temos o completo entendimento do mecanismo envolvido na osteogênese e na formação óssea ao redor dos implantes. Este estudo busca avaliar a influência da nanotopografia de titânio sobre a expressão de marcadores osteogênicos em ratos. Para isso foram utilizados implantes com 3 tipos de superfícies: usinada, com micro e com nanotopografia. Esses eram instalados aleatoriamente nas tíbias de 24 ratos Wistar. Foram utilizados 12 implantes de cada superfície totalizando 36 implantes. Estes estavam divididos em 3 grupos de 8 animais, n=4, o grupo 1 com um tempo de avaliação de 4 dias, grupo 2 com 7 dias e o grupo 3 com 14 dias. Após o sacrifício dos animais as amostras foram armazenadas, em seguida feita a análise da expressão dos genes Runx2 e Col1a1 do tecido adjacente aos implantes. A análise revelou que os tratamentos das superfícies de titânio influenciaram a expressão de Runx2 e Col1a1. A expressão de Col1a1, foi aumentada nas superfícies com nanotopografia no período inicial, porém no grupo com 14 dias não foi observada alterações na expressão do gene. A transcrição de mRNA Runx2, não foi regulada pelo tratamento da superfície de titânio no período de 4 dias, mas foi regulada nos tempos de 7 e 14 dias. Aos 7 dias, os níveis de expressão de Runx2 diminuíu na superfície de microtopografia e foi ligeiramente aumentada na superfície com nanotopografia, quando comparadas com a superfície usinada. Comparadas aos 14 dias, todas as superfícies foram semelhantes. Os tratamentos de superfície demonstraram modificar o padrão da expressão gênica nos períodos iniciais da osteogênese. A superfície de titânio com nanotopografia demonstrou favorecer uma maior expressão de genes envolvidos no processo da osseointegração.

Palavras-chave: Implantes dentários; Osteogênese; Topografia;

ABSTRACT

The osseointegration on titanium surfaces have been extensively investigated, however, a complete understanding of the mechanism involved in osteogenesis and bone formation around the implants still not well understood. This study aims to evaluate the influence of titanium nanotopography on the expression of osteogenic markers in rats. For this 3 types of surfaces were used with: machined, micro and nanotopography. These were installed randomly in the tibias of 24 Wistar rats. A total of 12 implants of each surface were used totaling 36 implants. They were divided into 3 groups of 8 animals each, n=4, the group 1 with an avaluation period of 4 days, 7 days group 2 and group 3 to 14 days. After sacrificing the animals, the samples were stored in a RNeasy Lysis Solution and made the extraction of gene expression of Runx2 and Col1a1 genes in adjacent tissue to implants. Gene expression analysis revealed that the titanium surface treatments affected the expression of Runx2 and Col1a1. Expression of Col1a1 was increased with nanotopography in the initial period, but in the group with 14 days there was no change. Runx2 transcription of mRNA, was also regulated by surface treatment in 7 and 14 days but it was not within 4 days. At 7 days, the Runx2 expression levels decreased for microtopography and was slightly increased with nanotopography compared with the machined surface. Compared to 14 days, all surfaces were similar. Surface treatments demonstrated to modify the pattern of gene expression in the initial periods of osteogenesis. The titanium surface with nanotopography further demonstrated enhanced expression of involved genes in the osseointegration process.

Keywords: Dental implants; Osteogenesis; Topography.

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1 - Desenho do implante da NEODENT.....	23
Figura. 3- Rato macho Wistar.....	25
Figura. 4 - (A) Implante usinado; (B) Implante microtopografia; (C) implante nanométrico.	25
Figura. 5 - Anestesia geral.....	26
Figura. 6 - Antissepsia.....	26
Figura. 7 - Anestesia local.....	26
Figura. 8 - Incisão plano epitelial.....	27
Figura. 9 - Incisão plano muscular.....	27
Figura. 10 - Perfuração óssea.....	28
Figura. 11 - Implante instalado.....	28
Figura. 12 - Perfuração grupo controle.....	28
Figura. 13 - Remoção do implante.....	29
Figura. 14 - Remoção do fragmento ósseo.....	30
Figura. 15 - Armazenamento do implante.....	30
Figura. 16 - Armazenamento do fragmento ósseo.....	30
Figura. 17 - Col1a1 4 dias.....	32
Figura. 18 - Col1a1 7 dias.....	33
Figura. 19 - Col1a1 14 dias.....	33
Figura. 20 - Col1a1 para 4, 7 e 14 dias.....	33
Figura. 21 - Runx2 4 dias.....	34
Figura. 22 - Runx2 7 dias.....	34
Figura. 23 - Runx2 14 dias.....	35
Figura. 24 - Runx2 para 4, 7 e 14 dias.....	35

1. INTRODUÇÃO

A osseointegração sobre superfícies de titânio tem sido extensamente investigada e os implantes osseointegrados são extremamente bem sucedidos na reabilitação oral^{1; 2; 3}. Entretanto, não temos o completo entendimento do mecanismo envolvido na osteogênese e na formação óssea ao redor dos implantes.

A interação primária entre o implante e o osso remanescente ocorre através da adsorção de moléculas de água e íons, seguidos pelas proteínas do plasma sanguíneo. Titânio e suas ligas têm a habilidade de permitir a nucleação de fosfato de cálcio sobre as superfícies, sendo que o fosfato de cálcio formado sobre o titânio comercialmente puro na sua maior parte é similar a apatita⁴. Mais que isso, íons modulam a adesão de proteínas, e o Ca^{2+} extracelular é conhecido por ligar proteínas ao TiO_2 ^{5; 6}. A parte dos implantes em contato com o osso interage com as proteínas do plasma, por exemplo, fibrinogênio, albumina e imunoglobulina G^{5; 7}. A adsorção de proteínas pode, em adição, ser alterada pelas características das superfícies, como a topografia⁷ e as propriedades físico-químicas⁸.

A superfície dos implantes há tempo tem sido considerada um dos fatores importantes para a osseointegração⁹. Uma formação óssea mais rápida e mais forte durante o processo de reparação é desejada. Um dos campos em que as pesquisas buscam meios de potencializar o processo de osseointegração é através do estudo das modificações de superfície de biomateriais.

As alterações de superfícies geram estruturas mensuráveis nas escalas milimétricas (mm), micrométricas (μm) e nanométricas (nm). O conhecimento de como essas alterações influenciam o processo de reparo in vivo tem se limitado a escala de mm (desenho do implante) e μm (rugosidade da superfície)¹⁰. No entanto, mudanças sobre as superfícies dos implantes na escala micrométrica podem também resultar em mudanças na escala nanométrica¹¹. Como varias técnicas para alteração das estruturas podem ser usadas, e o efeito de cada uma delas ainda não foi completamente avaliado.

Nanoestruturas têm sido sugeridas pela importância na integração óssea com os implantes, por afetarem a capacidade de molhamento, a adsorção de íons e

proteínas, e principalmente por afetarem diretamente a resposta celular¹². A resposta óssea em modelos animais foi aumentada pela presença de nanoestruturas sobre a superfície do titânio^{13; 14}. A relevância clínica das estruturas nanométricas ainda não é bem conhecida, estudos in vitro demonstraram a importância dessas estruturas^{15; 16}. Nanoestruturas podem ser de grande importância para a adsorção de proteínas à superfície, o que pode influenciar os estágios iniciais da formação óssea acelerando o processo^{17; 18; 19; 20}.

As pesquisas atuais estão focadas na expressão gênica e nos mecanismos moleculares das células envolvidas na osteogênese ao redor dos implantes¹⁷. O mecanismo molecular da osseointegração, a importância das células progenitoras mesênquimais e das células hematopoiéticas (plaquetas, neutrófilos, células endoteliais, monócitos, linfócitos, e osteoclastos) e os fatores de crescimento que iniciam outros eventos celulares são discutidos²¹. O efeito das citocinas ou outros fatores de transcrição variam de acordo com o tipo celular e de acordo com específicos receptores celulares, conseqüentemente, uma substância pode ativar vários processos intercelulares. A multifuncionalidade de diversas moléculas envolvidas no processo do reparo ósseo revela a complexidade do sistema biológico e também o fato de não termos o completo entendimento deste mecanismo²². As células podem interagir com as superfícies via receptores/adesão de moléculas, como imunoglobulinas, caderinas e integrinas. Integrinas podem formar complexos com sequência RGD (arginina - glicina - ácido aspártico) e podem, através disso, se ligar a certos complexos com sequência RGD que contém proteínas (ex, fibronectina) ou outros com receptores celulares depositados sobre superfícies^{23; 24; 25; 26}. A osseointegração ocorre via componentes celulares e por meios físico-químicos²⁷.

Estudos biomoleculares e dos efeitos celulares das características das superfícies são de fundamental importância para o conhecimento do papel das diferentes superfícies de titânio no processo de formação da matriz mineralizada¹⁷. Este estudo busca avaliar a influência da nanotopografia de titânio sobre a expressão de marcadores osteogênicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Existe um grande número de métodos para modificações de superfícies, no entanto não está claro qual o tipo de modificação é melhor. A maioria dos estudos comparam superfícies usinadas com superfícies que apresentam novas topografias. Não só a topografia pode ser alterada, mas também alterações químicas podem ser feitas sobre as superfícies. Esses tratamentos incluem: tratamentos físicos (usinagem, jateamento abrasivo, irradiação ultravioleta e ablação a laser), tratamento eletroquímico (oxidação anódica), tratamento químico (condicionamento ácido), e tratamento de deposição (íons)²⁸, e são descritos abaixo:

Tratamentos físicos:

Processo de Torneamento ou Usinagem

O processo de torneamento ou usinagem dos implantes é frequentemente usado para obtenção da macro-geometria do implante. Estas superfícies podem ter diferentes características de rugosidades, mas geralmente são lisas ($<0,5 \mu\text{m}$) ou minimamente rugosas ($0,5-1 \mu\text{m}$).

Processo de Jateamento Abrasivo

O processo de jateamento pode originar inúmeras superfícies de diferentes tipos de rugosidades e superfícies modificadas quimicamente, nesse processo o TiO_2 (óxido de titânio) e Al_2O_3 (óxido de alumínio) são as partículas mais comuns. Existem superfícies comerciais somente jateadas ou em combinação com outros processos. A maioria das superfícies jateadas possui uma rugosidade mínima a moderada ($1-2 \mu\text{m}$).

Irradiação ultravioleta de superfícies cristalinas de TiO_2

Tratando uma superfície com irradiação ultravioleta, a decomposição de compostos orgânicos ocorre, e obtém-se uma superfície extremamente limpa, a interação do oxigênio com moléculas de água forma grupos de hidroxila com característica hidrofílica na camada mais externa da superfície. Tratamentos

químicos em adição podem ser aplicados a essas superfícies e influenciar os efeitos fotocatalíticos.

Ablação a laser

As superfícies podem ter sua topografia alterada pelo processo de ablação por meio de uma fonte de laser. O processo de fusão e solidificação criam diferentes rugosidades e porosidades sobre as superfícies, isto gera uma formação de uma fina camada de óxido e favorece propriedades das superfícies como a dureza e a resistência à corrosão. A camada de TiO_2 formada sobre a superfície favorece a adesão de apatita graças à alta afinidade química que existe entre TiO_2 e hidroxiapatita. Os efeitos biológicos indicam que o tratamento por ablação pode gerar superfícies que favorecem a adesão e crescimento celular.

Tratamentos eletroquímicos:

Oxidação anódica

As superfícies anodizadas adquirem poros irregulares, que dependem do tipo de eletrodo e também da voltagem/corrente do processo de oxidação. O processo pode criar estruturas nanotubulares. A superfície tem uma rugosidade moderada, com estruturas de diâmetro de 0,5-3 μm em geral.

Tratamentos químicos:

Condicionamento ácido

O condicionamento ácido cria superfícies com diferentes características. O tratamento químico é uma maneira versátil de gerar nanoestruturas, inclusive associado a uma microtopografia já existente.

Tratamentos de deposição

Íons

Quando os íons são bombardeados contra a superfície usando baixas energias, diversos íons podem ser depositados em várias profundidades e em concentrações controladas. A deposição iônica pode ser executada sobre qualquer

topografia, mas seu resultado depende da dureza do material.

Em uma análise das propriedades das superfícies de implantes²⁹ foram avaliadas as características mecânicas, topográficas, físicas e os mecanismos de adesão. As propriedades de um implante oral podem ser subdivididas em mecânicas, topográficas e físico-química. Propriedades topográficas são avaliadas no nível micrométrico sendo que superfícies com rugosidade moderada são classificadas entre 1,0 e 2,0 μm de partículas e mostram melhores respostas ósseas do que as superfícies menos rugosas ($< 1,0 \mu\text{m}$) ou mais rugosas ($> 2,0 \mu\text{m}$). A maioria dos implantes comercializados atualmente possuem rugosidade moderada. As superfícies alteradas com agentes bioquímicos tais como os fatores de crescimento ósseo têm sido desenvolvidas. Os autores concluíram que as superfícies moderadamente rugosas parecem ter algumas vantagens clínicas sobre superfícies menos rugosas ou extremamente rugosas, mas as diferenças são pequenas e muitas vezes não são estatisticamente significante.

Em uma revisão, Coelho et al.³⁰ abordaram métodos de pesquisa básica e tendências atuais das superfícies de implantes dentários, verificaram a falta de pesquisas in vitro, in vivo e estudos clínicos, o que tem impedido os pesquisadores de biomateriais de definirem com claras justificativas e fundamentadas o melhor desenho de superfície dos implantes. Esse trabalho contém também uma visão geral da textura da superfície dos implantes disponíveis comercialmente e suas modificações químicas, incluindo novos processos baseados na fabricação da nanotecnologia, visto que durante a última década, a texturização da superfície dos implantes tem sido o parâmetro mais utilizado para estimular o aumento da resposta do hospedeiro-implante. Recentemente os trabalhos sobre superfícies dos implantes dentários mostram que estas modificações reduzem o tempo de osseointegração em uma escala físico/químicas com características nanométricas mostrando o potencial de sinergia usando tanto a textura quanto a inclusão de componentes bioativos de cerâmica na superfície dos implantes dentários. Apesar das modificações superficiais dos implantes serem mostradas como um fator de melhora para a osseointegração nos tempos iniciais, informações sobre o seu benefício a longo prazo são necessárias devido ao número reduzido de trabalhos clínicos controlados. Tendo em conta os vários estudos sobre implantes/superfícies, pode-se concluir que

os profissionais devem buscar uma maior fundamentação teórica antes do uso de qualquer implante dentário.

Em uma revisão sistemática Albrektsson & Wennerberg³¹ avaliaram as superfícies dos implantes orais mais conhecidos comercialmente no mercado europeu e estudaram as superfícies mais utilizadas na prática clínica, fabricadas por cinco empresas de implantes orais (Nobel Biocare, Straumann, 3i, Dentsply/Friadent e Astra Tech). Foram analisados separadamente estudos clínicos comparativos, retrospectivos e prospectivos, assim como os estudos de implantes em conjunto com enxertos ósseos. Estes estudos apresentavam pouco tempo de acompanhamento, sendo: Nobel Biocare – 1 a 2 anos, Straumann – 3 anos, 3i - 5 anos, Dentsply/Friadent - 3 anos, e Astra Tech - 10 anos. Em geral, os implantes orais são introduzidos comercialmente sem documentação clínica adequada sendo que as empresas de implantes acabam iniciando um acompanhamento dos seus produtos após o seu lançamento. Os padrões de relatórios clínicos têm melhorado ao longo dos anos. Porém apenas a Astra Tech publicou trabalhos adequados a longo prazo.

Kang et al.³² avaliaram a composição química e a morfologia dos implantes dentários disponíveis comercialmente (Nobel Biocare TiUnite, Astra AB Osseo speed, 3i OSSEOTITE, e Straumann-SLA) através da espectroscopia de raios X de fotoelétrons (XPS) e espectroscopia de elétrons, para a análise da composição química da superfície. A morfologia foi investigada através da microscopia eletrônica de varredura. A técnica de condicionamento ácido para as superfícies Osseo Speed, OSSEOTITE e SLA mostrou geralmente TiO_2 na morfologia da superfície. No entanto o processo de oxidação eletroquímica para os implantes TiUnite não só produziram uma superfície micro porosa (tamanho dos poros: 0,5-3,0 μm), mas também apresentou alterações químicas da superfície. Como resultado, os implantes TiUnite contiveram mais do que 7% de Fósforo (P) na camada de óxido e maiores quantidades de hidróxidos em comparação com os outros implantes na análise de XPS. Flúor (F) nos implantes Osseo Speed foi detectado em 0,3% tanto antes como depois da limpeza. Os resultados demonstraram diferenças significativas das propriedades das superfícies. As técnicas de jato e de ácido, geralmente, não alteraram os elementos de superfície do titânio, que consiste basicamente TiO_2 , mas altera a morfologia da superfície. O processo de oxidação eletroquímica, não só

muda a composição química da superfície, mas também produziu superfícies micro porosas. Além da superfície química do TiO_2 , para todas as amostras, a superfície química do TiUnite é caracterizada pela incorporação P em uma camada de óxido de titânio.

Em um recente estudo Rosa et al.¹⁰ avaliaram as diferenças de 4 marcas comerciais de implantes dentários fabricados no Brasil e Coréia analisando os valores das rugosidades e suas características. Foram utilizados três implantes de empresas Brasileiras (Titaniumfix, Neodent e Biomet 3i do Brasil) e um implante de uma empresa Coreana (Oneplant), estes foram analisados qualitativamente através da microscopia eletrônica de varredura e a caracterização quantitativa foi realizada através de um interferômetro. Os implantes analisados apresentaram uma variação significativa nos valores das rugosidades, sendo a rugosidade maior para a marca coreana Oneplant de 1,01 μm , seguido pela Titaniumfix com 0,90 μm , Neodent 0,67 μm , e Biomet 3i do Brasil 0,53 μm . As imagens da microscopia eletrônica de varredura, mostraram padrões muito diferentes entre as superfícies examinadas. O tratamento de superfície por si só não é capaz de determinar os valores de rugosidade e características.

Estudos in vitro também são empregados para a avaliação das superfícies de Titânio. Mustafa et al.³³ estudaram através de cultura de osteoblastos, derivados de osso mandibular humano, o complexo processo da formação na interface osso-implante, examinando o efeito da variação da rugosidade da superfície do material na adesão, proliferação e diferenciação celular. Foram utilizados 4 tipos de superfícies, sendo uma usinada servindo como grupo controle e os outros 3 tipos alteravam o tamanho das partículas de TiO_2 , um com partículas de 63-90 μm , outro com 106-180 μm e outro com 180-300 μm de partículas de TiO_2 . Foram feitas análises por microscopia eletrônica de varredura e de varredura a laser confocal. As áreas de células foram medidas usando um analisador semi-automático de imagem interativa. No entanto, a análise da atividade de fosfatase alcalina não revelou diferenças significativas entre os quatro modificações superficiais. Conclui-se que, neste modelo celular, a proliferação e diferenciação de células derivadas de osso mandibular humano é aumentada pela rugosidade da superfície do implante de titânio. No entanto, o aumento do tamanho das partículas do jato de 300 μm não

aumentou ainda mais a adesão inicial das células em comparação às superfícies usinadas e jateadas com partículas 63-90 μm de TiO_2 .

Oliveira e Nanci¹⁵ estudaram a formação de osso em torno dos implantes e verificaram que esta formação é influenciada pela rugosidade da superfície do implante. Foi avaliada a influência da nano texturização da base do titânio de superfícies sobre a expressão das proteínas da matriz por culturas de células osteogênicas em períodos iniciais. As células foram obtidas por digestão enzimática de calvária de ratos recém-nascidos e cultivadas em discos de titânio, ligas de titânio com superfícies nano texturizadas ou usinadas, e sobre lamínulas de vidro, por um período de 6 horas, 1 dia, e 3 dias, sob condições de cultura padrão. As culturas foram processadas por imunomarcção simples ou dupla com anticorpos monoclonais e/ou policlonais contra a sialoproteína óssea (BSP), a fibronectina (FN), osteopontina (OPN), tipo-I pró-colágeno, ou tubulina, seguida por anticorpos secundários fluoróforo conjugados. Algumas amostras foram processadas para serem analisadas através da microscopia eletrônica de varredura da morfologia e marcação imunohistoquímica. Após 6 horas, as superfícies nano texturizadas exibiram um aumento de até 9 vezes na proporção de células com marcação de OPN na periferia da célula. No terceiro dia, a proporção de OPN e no padrão de expressão e a proporção de células imunorreativas para a FN ou tipo I pró-colágeno. Os resultados demonstraram que a nano texturização de superfície à base de titânio regula a expressão precoce de BSP em culturas de células osteogênicas.

Avaliando a resposta óssea ao redor dos implantes de titânios revestidos com laminina-1 Bougas et al.³⁴ utilizaram 45 ratos divididos em 3 grupos. Foram instalados 2 implantes em cada rato, um do grupo teste (com laminina-1) e outro grupo controle, sem a laminina-1. Cada grupo foi analisado em diferentes períodos, sendo um com 3 dias, outro com 7 dias e outro com 21 dias. Foram analisados diversos marcadores pela técnica de RT-PCR, tais como: marcadores de osteoblastos: fosfatase alcalina, runx-2, osteocalcina, colagênio do tipo I, proteína morfogenética óssea 2, para os marcadores de osteoclastos: catepsina K e tartarato resistente fosfatase ácida, marcadores de inflamação: fator de necrose tumoral α , interleucina 1β , interleucina 10 e integrina $\beta 1$. Após 3 dias, a expressão de marcadores ósseos foi maior para o grupo de controle (sem laminina 1). Após 7 dias, a expressão da integrina $\beta 1$ e os marcadores osteogênicos foi aumentado para o

grupo de teste, enquanto que a catepsina K e os marcadores de inflamação foram diminuídos. Ao analisar o contato osso-implante e área óssea os autores não encontraram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Concluíram que o revestimento de implantes com laminina-1 altera a expressão dos genes na interface osso-implante. Porém, os métodos tradicionais de avaliação, não conseguiram detectar alterações decorrentes do tempo curto.

Através de uma revisão sistemática Wennerberg e Albrektsson³⁵ analisaram os possíveis efeitos da topografia da superfície do titânio em relação a osseointegração. Foram selecionados 100 artigos, esses continham a resposta óssea avaliada com histomorfometria (contato osso-implante), análises de torque de remoção, e testes com análises experimentais. Alguns estudos clínicos foram incluídos, nos quais os parâmetros de perda óssea e a sobrevivência do implante foram avaliados e relacionados com a rugosidade das superfícies. Um grande número de trabalhos mostrou que a topografia da superfície do implante influencia a resposta biológica, sendo que, as superfícies com rugosidade $>0,5\mu\text{m}$ e levemente rugoso $>0,5-1,0\mu\text{m}$, apresentaram uma resposta óssea menor do que as superfícies rugosas. Superfícies com uma rugosidade moderada $>1\mu\text{m}-2\mu\text{m}$, apresentaram uma resposta melhor que as rugosas $>2\mu\text{m}$. Uma dificuldade encontrada foi a de comparar estudos devido a variação das avaliações de superfície, além da falta de padronização no que se referia a caracterização da rugosidade. Concluíram que, a topografia da superfície influencia na resposta óssea em um nível micrométrico, e que existem indícios de que a topografia da superfície influencia a resposta óssea em uma escala nanométrica. A maioria dos trabalhos publicados caracterizavam as superfícies erroneamente. Os autores ressaltam que a mensuração e evolução das técnicas devem ser padronizadas com parâmetros não apenas descritivos de altura, mas também os espaciais.

Os mesmos autores³⁶ avaliaram através de outra revisão sistemática o revestimento em implantes com fosfato de cálcio na escala em micrométrica, bem como na nanométrica, e também sua influência sobre a formação óssea. Apenas os estudos in vivo foram considerados. A capacidade de formação óssea melhorou significativamente associando o revestimento de fosfato de cálcio sobre os implantes e isso é frequentemente relatado, mas a importância dos vários modos de introduzir

alterações superficiais, é geralmente muito difícil de analisar. Vários estudos mostram que a diferença dos resultados é devida à alteração química, mas também pode ser através da topografia das superfícies. Os poucos estudos que foram publicados indicam que as estruturas nanométricas podem ter um impacto sobre a formação óssea em seu período inicial. No entanto, o tamanho ideal e a distribuição das partículas ou poros aplicados sobre as superfícies dos implantes são ainda desconhecidas.

Estudos visando um melhor entendimento utilizando métodos biomoleculares tem sido relatados na literatura. Yamano et al.³⁷ buscaram verificar as reações do tecido peri-implantar com os diferentes tipos de topografias das superfícies dos implantes de titânio. Avaliaram 2 tipos de superfícies: rugosa e SLA, esses foram colocados na região de 1 molar após 1 mês da exodontia de 15 ratos machos. Avaliaram a mucosa peri-implantar em 4 e 7 dias (período inicial). Após as instalações dos implantes, avaliaram a orientação das fibras colágenas e os genes da matriz extracelular através da fluorescência com microscópio de força atômica. Verificaram que na superfície do implante SLA as fibras colágenas se encontravam paralelas e uniformes em ambos os dias 4 e 7, o implante rugoso as fibras colágenas no grupo de 7 dias estavam irregulares e não estavam paralelas. Eles concluíram que os resultados deste estudo sugerem que a superfície do implante caracterizada SLA pode afetar o processo do contato, influenciando as orientações das fibras colágenas e expressão dos genes no estágio inicial.

Donos et al.³⁸ estudaram o perfil da expressão gênica na osseointegração, associando uma superfície modificada quimicamente hidrofílica em um modelo humano. Avaliaram 18 parafusos de implantes de titânio cilíndricos, 4 mm de comprimento e 2,8 mm de largura, com uma superfície áspera (SLA) e a mesma superfície áspera porém quimicamente modificada (SLActive), esses foram inseridos cirurgicamente na área de retro-molar de nove pacientes voluntários. Os implantes foram removidos através de uma broca trefina, após o período de 4, 7 e 14 dias de espera. O tecido que envolve o implante foi colhido, o RNA foi extraído e analisado, buscando identificar as diferenças entre os implantes testados nos dias 4, 7 e 14. Não houve diferenças nas categorias de genes que estavam representados no grupo do dia 4. No entanto, no grupo do dia 7, genes associados com o processo de osteogênese foram expressos em maior quantidade na superfície SLActive. A

osteogênese e angiogênese parecem ser reguladas pela BMP (*Bone morphogenetic protein*) e a sinalização de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), respectivamente. Em 14 dias, a sinalização de VEGF permaneceu maior na superfície SLActive, enquanto a sinalização de BMP foi maior na superfície SLA no que parecia ser uma resposta retardada da compensação. Comparando a superfície do SLA com o SLActive, o SLActive exerce uma influência pró-osteogênica e pró-angiogênica na expressão do gene em 7 dias.

Yamada et al.³⁹ estudaram o estágio inicial da osseointegração relatando a criação de uma superfície de titânio submicrométrica por uma combinação de oxidação anódica e jato de areia. Foram utilizados implantes usinados preparados através de uma liga Ti-6Al-4V em uma forma cilíndrica (1 mm de diâmetro e 2 mm de comprimento). Os implantes foram colocados em fêmur de ratos e submetidos a teste biomecânico, interfacial, e histológico em 1 e 2 semanas pós-implantação (n=6). Após os testes a força biomecânica da osseointegração aumentou continuamente da semana 1 para a 2 nos implantes com superfície submicro mas não para os implantes com superfície micrométrica. Houve um aumento significativo no contato osso-implante e no volume ósseo. Uma extensa área de tecido ósseo na interface implante e a superfície submicro foi mantida intacta após o teste biomecânico de cisalhamento, enquanto que a interface do implante de tecido micro-ruído mostrou uma abertura ao longo de todo o eixo do implante. Os autores concluíram que a superfície submicro criada por uma combinação de oxidação anódica e jato de areia melhora o processo de osseointegração.

Apesar do grande número de trabalhos abordando a modificação de superfícies de Titânio e a sua influência no processo de osseointegração, existe ainda uma grande lacuna no que diz respeito ao melhor tratamento a ser utilizado. Estudos *in vitro*, em animais e em humanos são encontrados na literatura e fica claro a dificuldade de comparação dos estudos e a falta de padronização das avaliações feitas. Atualmente grande importância tem sido dada à nanotopografia e aos estudos biomoleculares para melhor compreensão dos resultados *in vitro* e *in vivo* já relatados. Estudos focando os efeitos celulares das características das superfícies, seguindo métodos recomendados na literatura de correta caracterização das mesmas, são de fundamental importância para o conhecimento do papel das diferentes superfícies de titânio no processo de formação da matriz mineralizada¹⁷.

Junker et al.⁴⁰ avaliaram através de uma revisão sistemática a eficácia da integração óssea dos implantes orais desenvolvidos bem como as alterações de suas superfícies. Foram incluídos no trabalho estudos de animais, relatórios e estudos em humanos que apresentam percentual do contato osso-implante ou dados sobre testes mecânicos de trabalhos a partir do ano de 2008. Para os implantes orais desenvolvidos e comercializados foram selecionados 29 publicações e sobre as alterações superficiais experimentais 51 publicações preencheram os critérios de inclusão. Como demonstrado na literatura tratamentos de superfície dos implantes orais, como rugosidades de superfície, procedimentos que afetam a composição química, existem provas suficientes de que a rugosidade de superfície induz uma segura e previsível resposta entre o osso/implante, mas não é claro se este efeito é devido à rugosidade da superfície ou à mudança relacionada na composição. No entanto, há uma falta de estudos em seres humanos.

Em um estudo prospectivo Cochran et al.⁴¹ avaliaram se o implante com a superfície SLA com jateamento e ataque ácido pode ser previsivelmente e seguramente restaurado em 6 semanas após a cirurgia, pois analisaram que após estudos em animais e culturas de células o implante SLA mostrou que a superfície induz uma maior produção de proteína e uma maior diferenciação celular óssea. Foram analisados 326 implantes com 1 ano de controle e 138 implantes com 2 anos de controle, no total foram perdidos 3 implantes. Todos os implantes foram instalados no osso de qualidade tipo I, II e III, e colocados os pilares a 35N após 42 e 63 dias de implantação. Como pré-requisito os implantes não poderiam apresentar dor e nenhuma mobilidade. 307 implantes dos 464, foram ativados antes do período de espera, sendo uma taxa de sucesso de 99,3%, demonstrando portanto que a superfície SLA pode ser ativada no período de 6 semanas com uma alta previsibilidade de sucesso.

Lang & Jepsen⁴² avaliaram os estudos existente sobre os efeitos dos implantes e composições das superfícies na osseointegração, utilizaram 5 revisões narrativas e concluíram que a topografia da superfície a um nível micrométrico influencia a integração óssea; porém com a falta de padronização dos trabalhos fica novamente difícil a comparação. Os implantes desenvolvidos com alterações da

composição da superfície e topografia melhoram a integração óssea nos períodos iniciais.

Previamente a esse estudo a completa caracterização das superfícies utilizadas foi descrita^{18; 19; 28}. Resumidamente as características da topografia das superfícies foram qualitativamente avaliadas por microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (FEG-SEM). A química da superfície foi estudada através de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e microanálise de Raios-X. O resultado foi semelhante para todas as superfícies, mostrando que a sua modificação não resultou em alterações na composição química do material. A análise topográfica foi realizada utilizando interferômetro óptico e microscopia de força atômica (AFM). Três amostras foram incluídas na análise topográfica, e 6 áreas por amostras foram analisadas por ambos os tipos de teste. Os resultados mostram as diferenças nas topografias através de suas rugosidades.

Em um estudo prévio, utilizando as mesmas superfícies utilizadas nesse estudo, foi mostrado histologicamente em ratos, melhores resultados no que diz respeito ao contato osso-implante para a superfície com nanotopografia²⁸. Para compreender melhor o efeito da topografia do implante na resposta inflamatória Schwartz-Filho et al¹⁹ avaliou a resposta de fibroblasto gengivais humanos (HGFs) avaliando a liberação das citocinas em períodos de 24 horas e de 48 horas. Os autores concluíram que a nanotopografia da superfície pode ser importante no processo da modulação da resposta óssea. Em outro estudo¹⁸ os mesmos autores com o objetivo de observar o efeito morfológico e molecular da laminina-1 nos implantes nanoestruturados, revestiram os implantes nanoestruturados com laminina-1 em uma diluição de 100 µg/mL e inseriram em tíbias de coelhos, como grupo controle foram instalados implantes sem o revestimento da laminina-1. Após 14 dias os implantes foram removidos e submetidos a análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a uma análise de expressão gênica utilizando o RT-PCR. Após a coleta dos resultado o MEV mostrou que o tecido ósseo estava aderido aos implantes, tanto no grupo teste, quanto no grupo controle. A análise do RT-PCR mostrou que os marcadores osteoblásticos Runx-2, osteocalcinina, fosfatase alcalina e colageno tipo 1 foram maior no grupo teste que no grupo controle. Os marcadores inflamatórios interleucina-10 e de necrose tumoral-α também foram maiores nos grupos teste. As proteínas analisadas

mostraram que a superfície nanoestruturada apresenta os genes normais presentes no processo da osseointegração em maior número do que no grupo sem o revestimento da laminina-1.

Avaliar a influência da nanotopografia de titânio sobre a expressão de marcadores osteogênicos utilizando um modelo experimental animal em ratos é o que se busca nesse estudo.

3. PROPOSIÇÃO

Hipótese

1. A nanotopografia de titânio pode modular a expressão de marcadores osteogênicos durante a formação de matriz mineralizada e influenciar os resultados do processo de osseointegração.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a expressão de marcadores osteogênicos através das diferentes alterações da topográficas de titânio em ratos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras de titânio

As amostras de titânio utilizadas nesse trabalho foram confeccionadas e cedidas pela empresa NEODENT (Curitiba, Paraná, Brasil). O tamanho e o formato dos implantes foram especialmente desenhados na medida de (2,5mm x 1,5mm) (Figura. 1).

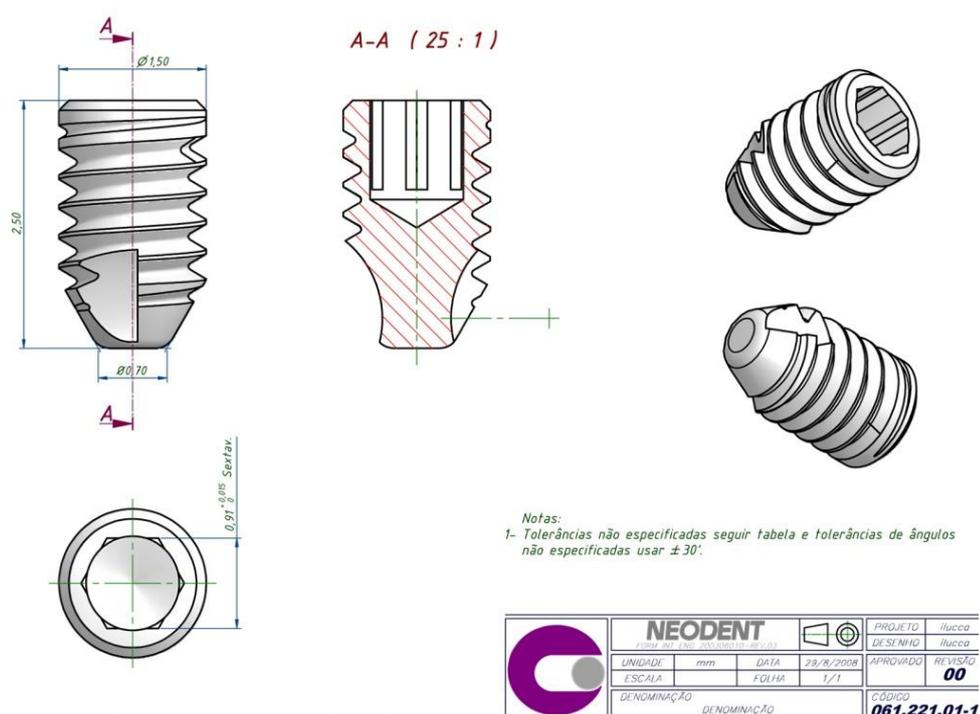


Figura. 1 - Desenho do implante da NEODENT.

Amostras de titânio comercialmente puro (grau 4) foram usinadas no formato de implantes, e submetidas a um processo de modificação de superfície. A microtopografia foi obtida por um processo de jateamento com partículas de óxido de Alumínio, seguido de um procedimento de condicionamento ácido (propriedade comercial). A nanotopografia foi obtida pelo tratamento com volumes iguais de uma solução de H_2SO_4 e de H_2O_2 a 30%⁴³.

Foram utilizadas 3 tipos de superfícies: usinada, com micro e com nanotopografia.

Caracterização das amostras de titânio

Para os estudos realizados com as superfícies já citadas avaliações quanto à caracterização da rugosidade, química e morfologia foram feitas previamente^{18; 19; 28}. Para tal foram seguidas as orientações sugeridas para a avaliação topográfica de superfícies de implantes⁴⁴. A caracterização da topografia das amostras foi feita no nível micrométrico usando interferômetro ótico (MicroXam; ADE Phase Shift Technology Inc., Tucson, EUA) e microscopia de força atômica (Dimension 3000 SPMTM, Digital Instruments, Santa Barbara, EUA) para avaliação na escala nanométrica. O cálculo paramétrico foi realizada após a remoção de erros de forma e ondulações por um filtro Gaussiano (50 mm × 50 mm). Os seguintes parâmetros tri-dimensionais foram selecionados: S_a (μm), referente rugosidade média; S_{ds} (μm^{-2}), referente a densidade de picos; e S_{dr} (%), referente ao aumento da área da superfície. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (LEO 440 – Zeiss, Oberkochen, Alemanha) foi utilizada para a avaliação da morfologia das superfícies (Figura. 2). E para avaliação da química de superfície foi utilizada a espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS; LEO 440). Três amostras de cada superfície foram selecionadas aleatoriamente para a caracterização.

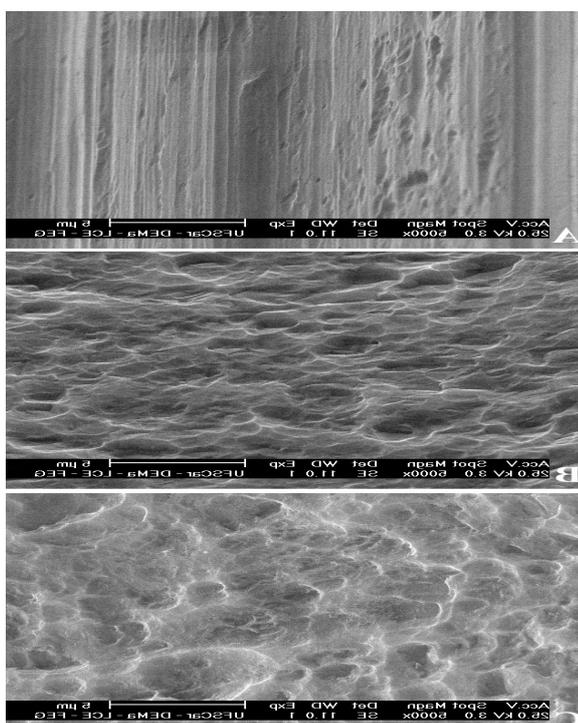


Figura. 2 - (A) MEV superfície usinada. (B) MEV superfície jateada. (C) MEV superfície nanométrica.

Animais e Instalação dos implantes

Foram selecionados 24 ratos Wistar machos (peso médio, 280-400 g) para o estudo (Figura. 3). Foram avaliados 3 tipos diferentes de superfícies de implantes: superfície usinada (Figura. 4 - A), superfície com microtopografia (Figura. 4 - B) e superfície com nanotopografia (Figura. 4 - C). Foram utilizados 12 implantes de cada superfície totalizando 36 implantes. Foram divididos em 3 grupos de 8 animais com diferentes tempos de espera a serem avaliados, n=4, o grupo 1 com um período de espera de 4 dias, grupo 2 com um período de espera de 7 dias e o grupo 3 com um período de espera de 14 dias, ambos os grupos foram sacrificados no mesmo dia. Todos os procedimentos estavam de acordo com o Comitê de Ética e Experimentação Animal do Mestrado em implantodontia – UNISA , número de registro CEP UNISA N. 23/2012: (Anexo 1).



Figura. 3- Rato macho Wistar.



Figura. 4 - (A) Implante usinado; (B) Implante microtopografia; (C) implante nanométrico.

Os animais foram submetidos à Anestesia geral realizada pela administração Subcutânea de Cetamina (40 a 80 mg/kg/IP) e Xilazina (5 a 10ml/kg/IP) (Figura. 5).

Antes da cirurgia, as patas traseiras foram desinfetadas com álcool iodado e

clorexidina (Figura. 6). Uma solução de mepivacaína 2% (DFL Indústria e Comércio S.A.) foi administrada como o anestésico local antes da incisão na dose de 1 mL (Figura. 7).

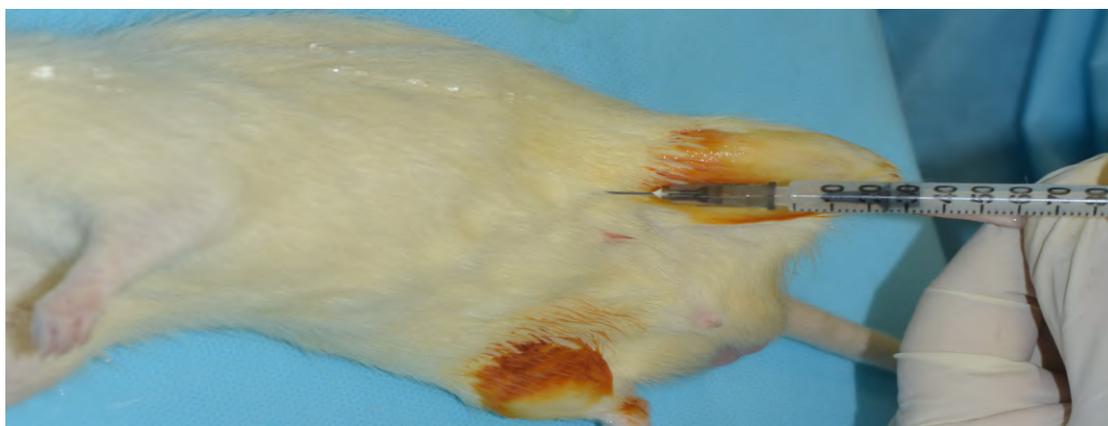


Figura. 5 - Anestesia geral.



Figura. 6 - Antissepsia.



Figura. 7 - Anestesia local.

Foi realizado então um incisão linear em dois planos iniciando no tecido

epitelial (Figura. 8) e em seguida no plano muscular deslocando a incisão um pouco mais interna à primeira incisão (Figura. 9), de forma que o local a serem feitas as instalações e perfurações ficassem mais distantes do acesso cirúrgico.



Figura. 8 - Incisão plano epitelial.



Figura. 9 - Incisão plano muscular.

Feita as incisões e descolamento do tecido, foi feito a perfuração óssea com uma broca de 1,1mm fornecida também pela NEODENT (Curitiba, Paraná, Brasil) (Figura. 10).



Figura. 10 - Perfuração óssea.

A instalação dos implantes com as respectivas superfícies foi realizada de forma aleatória (usinado, com micro, com nanotopografia) (Figura. 11) (Figura. 12). As amostras foram escolhidas e instaladas seguindo um processo de aleatorização.



Figura. 11 - Implante instalado.



Figura. 12 - Perfuração grupo controle.

Após o procedimento cirúrgico os animais receberam uma dose de antibiótico (Enrofloxacina – 10 mg/Kg) e Analgésico (Flunixin Meglumine – 2,5 mg/kg) pelo período de 5 dias.

Depois do período de espera os animais foram submetidos a anestesia geral realizada pela administração Subcutânea de Cetamina (40 a 80 mg/kg/IP) e Xilazina (5 a 10ml/kg/IP). Em seguida os animais foram sacrificados, com uma overdose de pentobarbital sódico 7mg/kg intraperitoneal.

As amostras foram coletadas removendo os implantes com uma chave digital de instalação (Figura. 13). As amostras do tecido ósseo foram removidas com o auxílio de uma broca trefina (3,75mm NEODENT Curitiba, Paraná, Brasil) (Figura. 14) e armazenados juntos em uma solução de RNAlater® Solution até a realização das análises (Figura. 15 e Figura. 16).



Figura. 13 - Remoção do implante.

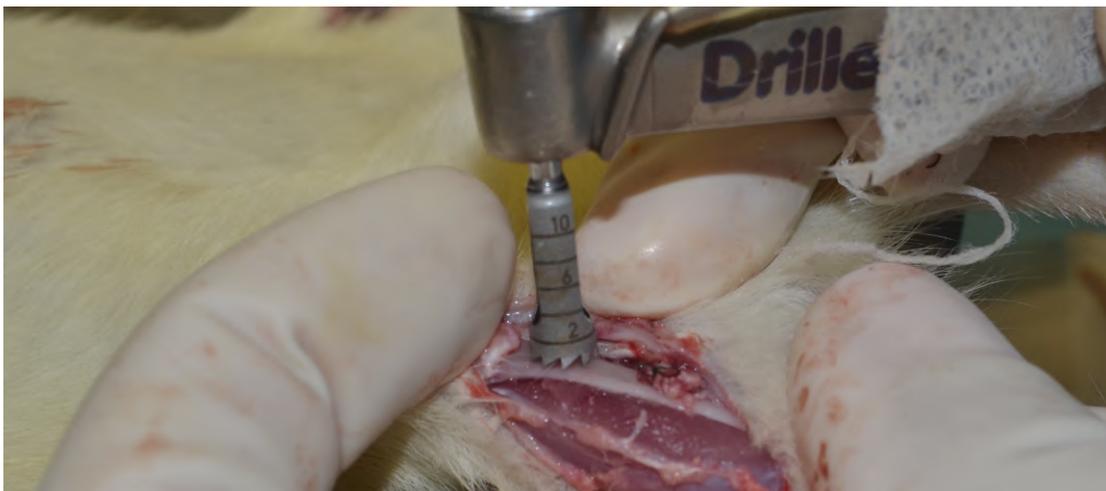


Figura. 14 - Remoção do fragmento ósseo.

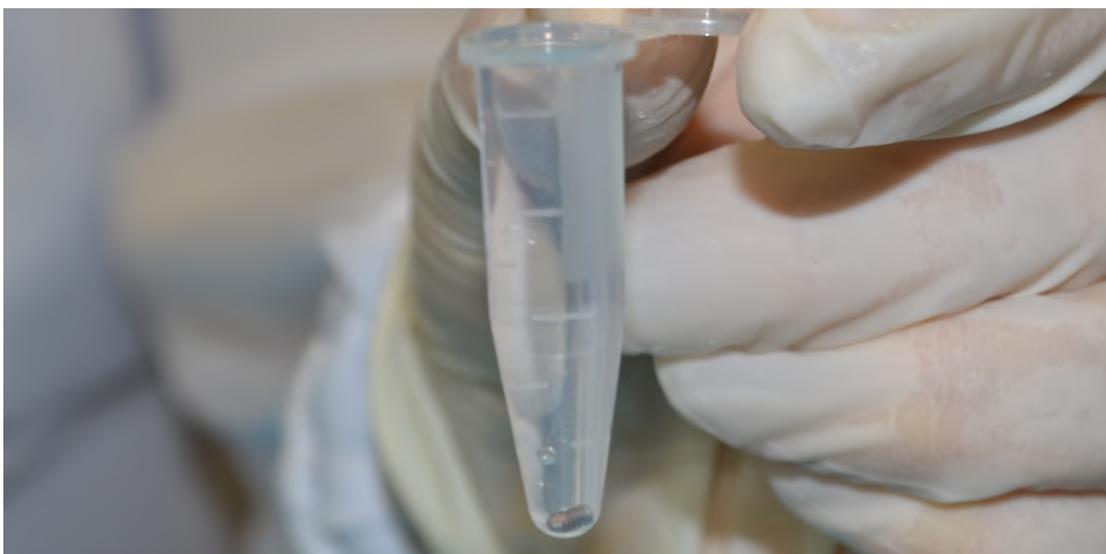


Figura. 15 - Armazenamento do implante.



Figura. 16 - Armazenamento do fragmento ósseo.

Extração de RNA e Análise da expressão gênica

Para análise da expressão gênica (Runx2 e Col1a1), amostras do tecido adjacente aos implantes foram avaliadas. As amostras obtidas foram armazenadas em solução *RNAlater*® (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) até a realização da análise. Para alcançar o RNA detectável, as amostras de cada grupo foram agrupadas para o isolamento do RNA. O RNA total foi isolado do tecido circundante usando o reagente Trizol® (Gibco BRL, Carlsbad, CA) e o kit de isolamento de tecido EZNATM RNA® (Omega Bio-Tek, Norcross, GA). O RNA total foi quantificado usando um espectrofotômetro (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Para cada amostra de RNA, cDNA foi sintetizado usando o kit "*High Capacity Reverse Transcription*" (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A reação de PCR quantitativo (qPCR) foi realizada utilizando o TaqMan Universal PCR Mastermix ensaio válido Taqman (Life Technologies Brasil LTDA, São Paulo) em um termociclador Step One Plus real-time (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Análise Estatística

Os dados foram registrados através de médias e desvios padrões. A normalidade dos dados foi verificada. As comparações entre os grupos foram realizadas através do teste não paramétrico (Kruskal-Wallis). O nível de significância de 0,05% será empregado em todas as análises estatísticas.

5. RESULTADOS

Expressão gênica

A análise de expressão gênica revelou que os tratamentos das superfícies de titânio influenciaram a expressão de Runx2 e Col1a1. A expressão de Col1a1 (Figura. 17) foi aumentada nas superfícies com nanotopografia e grupo controle depois de 4 dias em relação a superfície micro. No período de 7 dias, Col1a1 foi ligeiramente sobre-regulada na superfície com nanotopografia (Figura. 18). Estatisticamente não foram observadas alterações na expressão do gene Col1a1 para as superfícies tratadas, em comparação com a superfície usinada, no período de 14 dias (Figura. 19).

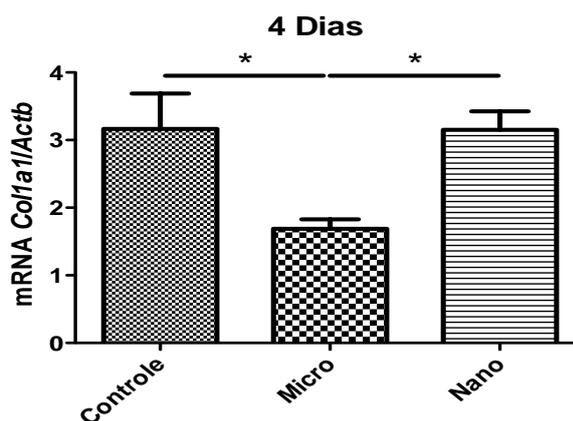


Figura. 17 - Col1a1 4 dias.

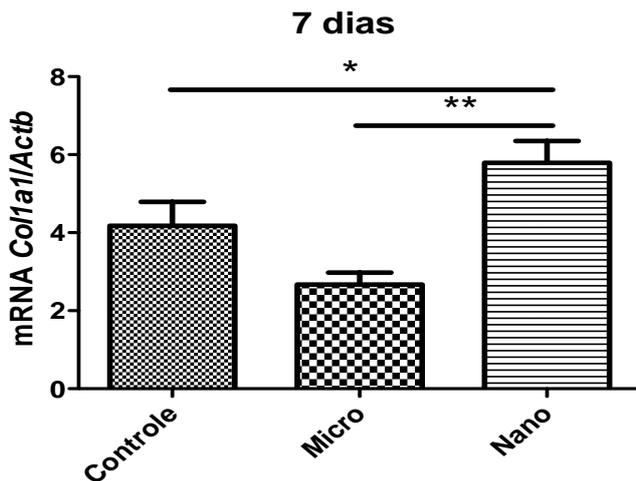


Figura. 18 - Col1a1 7 dias.

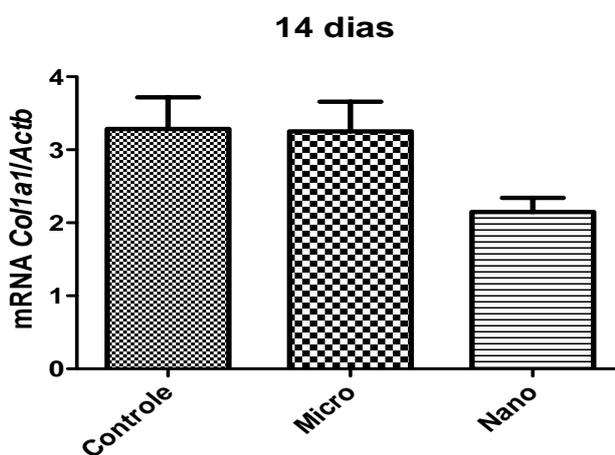


Figura. 19 - Col1a1 14 dias.

Normalize of Time-course Col1a1

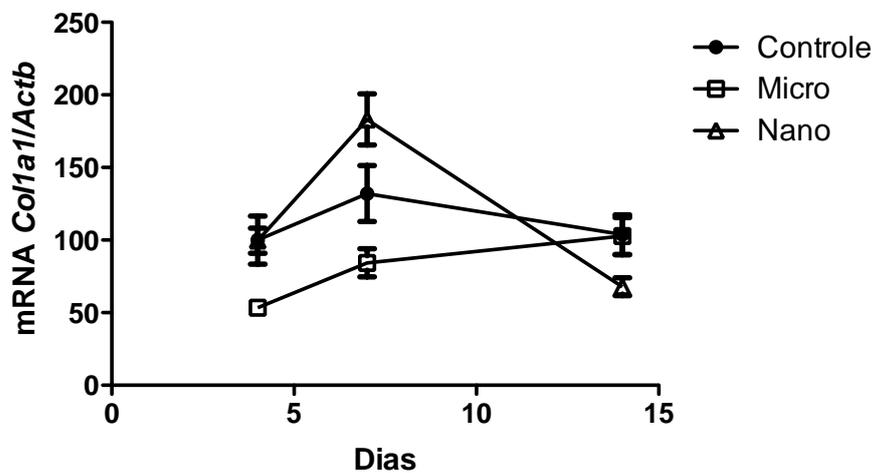


Figura. 20 - Col1a1 para 4, 7 e 14 dias.

O fator de transcrição de mRNA Runx2 foi também regulada pelo tratamento da superfície de titânio nos tempos de 7 dias (Figura. 22) e 14 dias (Figura. 23), mas não foi observada diferença no período de 4 dias (Figura. 21). Aos 7 dias, os níveis de expressão de Runx2 diminuiu na superfície de microtopografia e foi ligeiramente aumentada na superfície com nanotopografia, quando comparadas com a superfície usinada. Comparadas no período de 14 dias, a superfície com nanotopografia e microtopografia foram semelhantes, porém o grupo controle apresentou resultados bem superiores.

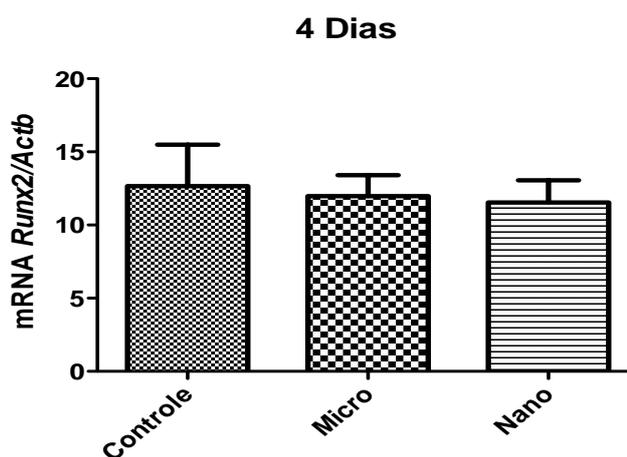


Figura. 21 - Runx2 4 dias.

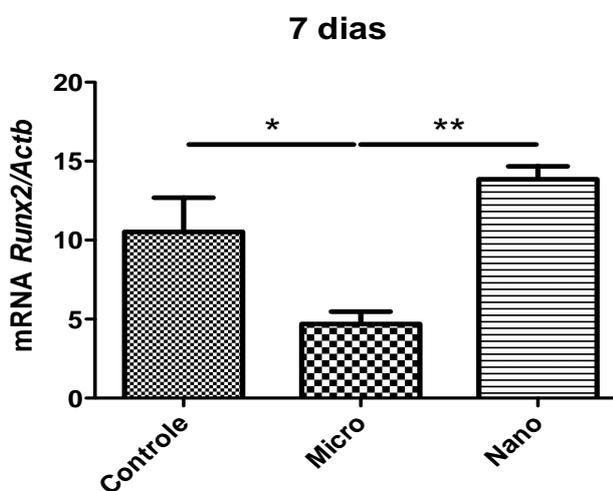


Figura. 22 - Runx2 7 dias.

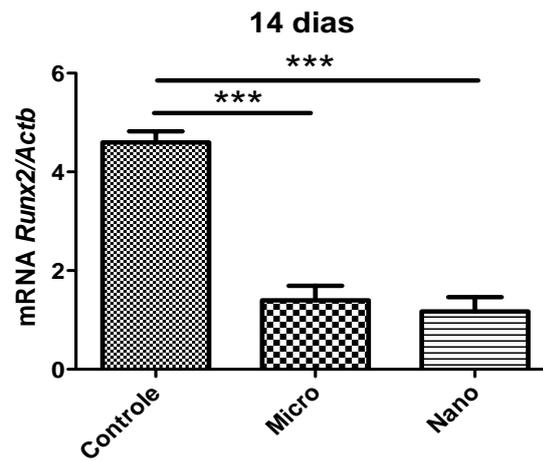


Figura. 23 - Runx2 14 dias.

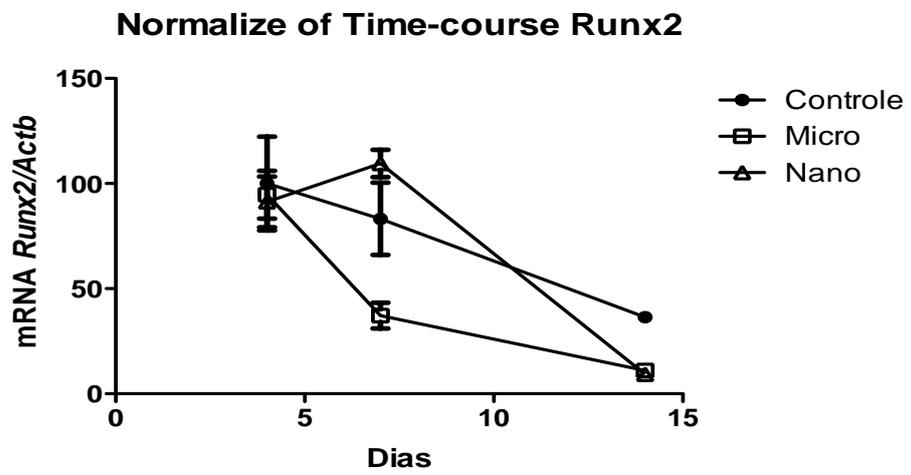


Figura. 24 - Runx2 para 4, 7 e 14 dias.

6. DISCUSSÃO

Esse trabalho buscou avaliar a expressão de genes importantes para a osseointegração em implantes com superfícies usinadas, com micro e nanotopografia, em um modelo experimental em ratos.

O tratamento de superfície é um dos fatores relacionados com o alto índice de sucesso dos implantes orais relatados na literatura atual⁹. A alteração da topografia vem demonstrando ser um dos principais fatores para o aumento de contato osso-implante, e redução no tempo do processo de osseointegração, propiciando assim melhores resultados clínicos⁴⁵.

Atualmente existe uma grande quantidade de métodos para a modificação das superfícies dos implantes encontrados no mercado^{10; 11}. Estudos *in vitro*^{15; 46}, *in vivo*^{47; 48} e em humanos^{38; 49} podem ser encontrados na literatura comprovando a importância do tratamento de superfície no processo de mineralização óssea. Entretanto, a maioria dos trabalhos nos mostra falhas nos critérios de caracterização das superfícies no que diz respeito à rugosidade, química e energia. Essa falta de padronização dificulta uma comparação direta dos diferentes tipos de tratamentos propostos^{35; 44}.

Segundo Cochran et al.⁴¹, Kang et al.³², Rosa et al.¹⁰, Yamada et al.³⁹, Albrektsson & Wennerberg³¹, Mustafa et al.³³, Oliveira e Nanci¹⁵, Bougas et al.³⁴, Wennerberg & Albrektsson⁴⁴ as empresas buscam melhorar e desenvolver novas superfícies de implantes, tais como a superfície nanométrica que vem demonstrando resultados satisfatórios indicando que estas modificações na superfície podem acelerar e aumentar o contato osso/implante, apresentando resultados significativamente superiores a respeito de uma maior formação de matriz óssea.

O Colágeno é o constituinte mais importante da matriz óssea extracelular⁵⁰. Osteoblastos são formados diretamente nos ossos intramembranosos, enquanto condrócitos formam primeiro um esqueleto cartilaginoso que é substituído pelos osteoblastos e osteoclastos através do processo de ossificação intramembranosa. A literatura mostra que Runx2 desempenha um papel fundamental na transformação

de células mesênquimais em células osteoprogenitoras, e também atua como fator de transformação na diferenciação de osteoprogenitores em condrócitos^{51; 52}.

Durante a diferenciação dos osteoblastos, Runx2 tem um papel essencial na diferenciação de células mesênquimais em células da linhagem osteoblástica⁵³. Após a diferenciação em células da linhagem osteoblástica, os osteoblastos expressam genes de proteínas da matriz óssea em diversos níveis, dependendo do seu nível de maturação celular. Células mesênquimais imaturas e pré-osteoblastos podem expressar Col1a1. Essa expressão pode ser regulada por osteoblastos imaturos⁵⁴ e uma possível interação entre a expressão dos genes avaliados no presente estudo deve ser considerada. Um favorecimento na expressão de Runx2 e Col1a1 pela influência das superfícies dos implantes poderia contribuir para aceleração do processo e modificação do padrão da mineralização óssea ao redor dos implantes.

Os estudos prévios acima citados justificam a necessidade de um aprofundamento nas análises da formação óssea sobre a nanotopografia. Os resultados descritos correspondem a expectativa de que a nanotopografia tem papel importante na modulação da resposta óssea evidenciados pela expressão de marcadores osteogênicos. Os resultados obtidos com este trabalho nos mostram e são evidenciados por Coelho et al.³⁰, Mustafa et al.³³, Yamano et al.³⁷, Yamada et al.³⁹ e Albrektsson et al.²⁹, que as alterações da superfície dos implantes em sua topografia pode estimular e guiar diversos processos moleculares e biológicos na osseointegração.

No caso da nanotopografia não existem estudos clínicos que evidenciem e comprovem sua participação na aceleração do processo. No entanto, há evidências de que ela possa acelerar o processo. As modificações na escala nanométrica apresentam resultados significativamente superiores a respeito de maior formação de matriz mineralizada in vitro, isto aumenta o contato osso implante, modulando a expressão de citocinas e expressão de genes relacionados com a osseointegração in vivo, isto é compreendido por Mustafa et al.³³, Oliveira e Nanci¹⁵. Contudo, estudos clínicos ainda precisam ser feitos para comprovar essa hipótese.

Coelho et al.³⁰ e Bougas et al.³⁴ relatam que os trabalhos que visam os aspectos moleculares nas modificações das superfícies relacionados a osseointegração, devem ser realizados para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos

nesse processo. Pois os resultados do presente estudo mostraram que a nanoestrutura de superfícies de titânio pode afetar importantes parâmetros da osteogênese in vivo, isso também foi relatado nos estudos feitos por Cochran et al.⁴¹, Yamano et al.³⁷ e Donos et al.³⁸

É consenso que existe a necessidade de uma correta caracterização e padronização das empresas em relação a nomenclatura utilizada a respeito da superfície e da topografia para que os estudos possam ser comparados adequadamente. Esta necessidade é exposta também por Wennerberg & Albrektsson³⁵ e Albrektsson et al.²⁹.

Não temos o completo entendimento do mecanismo por trás da osteogênese e da formação óssea ao redor dos implantes. Estudos biomoleculares e dos efeitos celulares provavelmente aumentarão a possibilidade de modificarmos as características das superfícies de uma forma mais adequada no futuro. Do mesmo modo estudos clínicos utilizando implantes com nanotopografia em suas superfícies devem ser realizados em pacientes para que possamos estudar e analisar os verdadeiros efeitos que estas modificações exercem sobre a resposta biológica.

7. CONCLUSÃO

A superfície de titânio com nanotopografia demonstrou favorecer a expressão dos genes Runx2 e Col1a1 envolvidos no processo da osseointegração em um modelo animal em ratos no período de 7 dias, para a superfície estudada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. **J Cell Biochem**, v. 56, n. 3, p. 340-7, Nov 1994.
- 2 PULEO, D. A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. **Biomaterials**, v. 20, n. 23-24, p. 2311-21, Dec 1999.
- 3 BERGLUNDH, T. et al. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 14, n. 3, p. 251-62, Jun 2003.
- 4 HANAWA, T.; OTA, M. Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution. **Biomaterials**, v. 12, n. 8, p. 767-74, Oct 1991.
- 5 ELLINGSEN, J. E. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. **Biomaterials**, v. 12, n. 6, p. 593-6, Aug 1991.
- 6 COLLIS, J. J.; EMBERY, G. Adsorption of glycosaminoglycans to commercially pure titanium. **Biomaterials**, v. 13, n. 8, p. 548-52, 1992.
- 7 SELA, M. N. et al. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 5, p. 630-8, Oct 2007.
- 8 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. 1269-79, Feb 2002.
- 9 ALBREKTSSON, T. et al. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta Orthop Scand**, v. 52, n. 2, p. 155-70, 1981.
- 10 ROSA, M. B. et al. The influence of surface treatment on the implant roughness pattern. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 5, p. 550-5, Sep-Oct 2012.
- 11 SVANBORG, L. M.; ANDERSSON, M.; WENNERBERG, A. Surface characterization of commercial oral implants on the nanometer level. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 92, n. 2, p. 462-9, Feb 2010.

- 12 MENDONCA, G. et al. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. **Biomaterials**, v. 29, n. 28, p. 3822-35, Oct 2008.
- 13 MEIRELLES, L. et al. Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. **J Biomed Mater Res A**, v. 87, n. 2, p. 299-307, Nov 2008.
- 14 MEIRELLES, L. et al. Effect of hydroxyapatite and titania nanostructures on early in vivo bone response. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 10, n. 4, p. 245-54, Dec 2008.
- 15 DE OLIVEIRA, P. T.; NANCI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 403-13, Feb 2004.
- 16 DE OLIVEIRA, P. T. et al. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. **J Biomed Mater Res A**, v. 80, n. 3, p. 554-64, Mar 1 2007.
- 17 JIMBO, R. et al. Genetic responses to nanostructured calcium-phosphate-coated implants. **J Dent Res**, v. 90, n. 12, p. 1422-7, Dec 2011.
- 18 SCHWARTZ-FILHO, H. O. et al. The effect of laminin-1-doped nanoroughened implant surfaces: gene expression and morphological evaluation. **Int J Biomater**, v. 2012, p. 305638, 2012.
- 19 SCHWARTZ-FILHO, H. O. et al. Titanium surfaces with nanotopography modulate cytokine production in cultured human gingival fibroblasts. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 10, p. 2629-36, Oct 2012.
- 20 JIMBO, R. et al. Histological and three-dimensional evaluation of osseointegration to nanostructured calcium phosphate-coated implants. **Acta Biomater**, v. 7, n. 12, p. 4229-34, Dec 2011.
- 21 COOPER, L. F. et al. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. **Biomaterials**, v. 27, n. 6, p. 926-36, Feb 2006.
- 22 ATHANASOU, N. A. Cellular biology of bone-resorbing cells. **J Bone Joint Surg Am**, v. 78, n. 7, p. 1096-112, Jul 1996.

- ²³ ZREIQAT, H. et al. Differentiation of human bone-derived cells grown on GRGDSP-peptide bound titanium surfaces. **J Biomed Mater Res A**, v. 64, n. 1, p. 105-13, Jan 1 2003.
- ²⁴ TOSATTI, S. et al. RGD-containing peptide GCRGYGRGDSPG reduces enhancement of osteoblast differentiation by poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol)-coated titanium surfaces. **J Biomed Mater Res A**, v. 68, n. 3, p. 458-72, Mar 1 2004.
- ²⁵ GARCIA, A. J.; REYES, C. D. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. **J Dent Res**, v. 84, n. 5, p. 407-13, May 2005.
- ²⁶ SCHLIEPHAKE, H. et al. Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 73, n. 1, p. 88-96, Apr 2005.
- ²⁷ PILLIAR, R. M. Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. **Implant Dent**, v. 7, n. 4, p. 305-14, 1998.
- ²⁸ SCHWARTZ-FILHO, H. O. **Ostegênese Sobre Titânio com Nanotopografia**. 2012. 148 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação Em Odontologia, Area de Concentração Periodontia, Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp, Araraquara.
- ²⁹ ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. **Int J Prosthodont**, v. 17, n. 5, p. 536-43, Sep-Oct 2004.
- ³⁰ COELHO, P. G. et al. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 88, n. 2, p. 579-96, Feb 2009.
- ³¹ ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. **Int J Prosthodont**, v. 17, n. 5, p. 544-64, Sep-Oct 2004.

- 32 KANG, B. S. et al. XPS, AES and SEM analysis of recent dental implants. **Acta Biomater**, v. 5, n. 6, p. 2222-9, Jul 2009.
- 33 MUSTAFA, K. et al. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. **Clin Oral Implants Res**, v. 12, n. 5, p. 515-25, Oct 2001.
- 34 BOUGAS, K. et al. Novel Implant Coating Agent Promotes Gene Expression of Osteogenic Markers in Rats during Early Osseointegration. **Int J Biomater**, v. 2012, p. 579274, 2012.
- 35 WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 20 Suppl 4, p. 172-84, Sep 2009.
- 36 Structural influence from calcium phosphate coatings and its possible effect on enhanced bone integration. **Acta Odontol Scand**, v. 67, n. 6, p. 333-40, 2009.
- 37 YAMANO, S. et al. Early peri-implant tissue reactions on different titanium surface topographies. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 8, p. 815-9, Aug 2011.
- 38 DONOS, N. et al. Gene expression profile of osseointegration of a hydrophilic compared with a hydrophobic microrough implant surface. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 4, p. 365-72, Apr 2011.
- 39 YAMADA, M. et al. Early-stage osseointegration capability of a submicrofeatured titanium surface created by microroughening and anodic oxidation. **Clin Oral Implants Res**, Jun 21 2012.
- 40 JUNKER, R. et al. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 20 Suppl 4, p. 185-206, Sep 2009.
- 41 COCHRAN, D. L. et al. The use of reduced healing times on ITI implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: early results from clinical trials on ITI SLA implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 13, n. 2, p. 144-53, Apr 2002.

- 42 LANG, N. P.; JEPSEN, S.; WORKING, G. Implant surfaces and design (Working Group 4). **Clin Oral Implants Res**, v. 20 Suppl 4, p. 228-31, Sep 2009.
- 43 NANCI, A. et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. **J Biomed Mater Res**, v. 40, n. 2, p. 324-35, May 1998.
- 44 WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 15, n. 3, p. 331-44, May-Jun 2000.
- 45 ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. The impact of oral implants - past and future, 1966-2042. **J Can Dent Assoc**, v. 71, n. 5, p. 327, May 2005.
- 46 SCHWARTZ FO, H. O. et al. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 3, p. 333-44, Jun 2007.
- 47 TAVARES, M. G. et al. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 4, p. 452-8, Aug 2007.
- 48 PAPALEXIOU, V. et al. Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study. **Clin Oral Implants Res**, v. 15, n. 1, p. 44-53, Feb 2004.
- 49 SHIBLI, J. A. et al. Histological comparison of bone to implant contact in two types of dental implant surfaces: a single case study. **J Contemp Dent Pract**, v. 8, n. 3, p. 29-36, 2007.
- 50 HOFSTETTER, W. et al. Modulation of human osteoblasts by metal surface chemistry. **J Biomed Mater Res A**, Jan 28 2013.
- 51 MARIE, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n. 2, p. 98-105, May 15 2008.

- 52 ZHANG, C. Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. **J Orthop Surg Res**, v. 5, p. 37, 2010.
- 53 KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. **Cell and tissue research**, v. 339, n. 1, p. 189-195, 2010.
- 54 INADA, M. et al. Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. **Dev Dyn**, v. 214, n. 4, p. 279-90, Apr 1999.

ANEXO 1

**PARECER N.º 23/2012**

REGISTRO CEP UNISA N.º 23/2012

Projeto de Pesquisa: "Influência da Nanotopografia de Titânio sobre a Expressão de Marcadores Osteogênicos em Ratos".

Pesquisadores Responsáveis: Humberto Osvaldo Schwartz Filho
Graduando: Thiago Conti Nemer

Curso: Odontologia

Prezado Pesquisador:

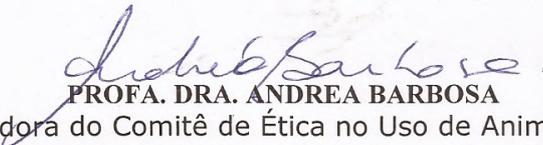
Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), esta de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca) que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, manifestando-se pela **APROVAÇÃO** do Projeto "**Influência da Nanotopografia de Titânio sobre a Expressão de Marcadores Osteogênicos em Ratos**".

*** Prezados Pesquisadores o CEUA solicita:**

- **Relatório da pesquisa ao término do prazo estipulado no cronograma do projeto.**
- **Ser informado sobre qualquer alteração na metodologia informada no Projeto de Pesquisa.**

São Paulo, 15 de Agosto de 2012.


PROFA. DRA. ANDREA BARBOSA

Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA
UNISA - Universidade de Santo Amaro