



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**



**HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO**

***OSTEOGÊNESE SOBRE TITÂNIO COM  
NANOTOPOGRAFIA***

ARARAQUARA  
2011



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**



**HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO**

*OSTEOGÊNESE SOBRE TITÂNIO COM  
NANOTOPOGRAFIA*

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PERIODONTIA, DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ODONTOLOGIA.

Orientadora: *Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio*

ARARAQUARA  
2011

Schwartz Filho, Humberto Osvaldo

Osteogênese sobre titânio com nanotopografia / Humberto Osvaldo  
Schwartz Filho. . – Araraquara: [s.n.], 2011.  
148 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

1.. Implantes dentários    2. Osteogênese    3. Nanotopografia  
I. Título

**HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO**

**OSTEOGÊNESE SOBRE TITÂNIO COM NANOTOPOGRAFIA**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

2º Examinador: Prof. Dr. Fábio André dos Santos

3º Examinador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

4º Examinador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Viera

5º Examinador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

Araraquara, 19 de setembro de 2011.

# ***DADOS CURRICULARES***

## ***Humberto Osvaldo Schwartz Filho***

**NASCIMENTO** 19 de janeiro de 1979 – Curitiba / PR

**FILIAÇÃO** Humberto Osvaldo Schwartz  
Norma Marli Dillenburg Schwartz

**1997-2001** Graduação em Odontologia  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

**2002-2004** Especialização em Periodontia  
Escola de Aperfeiçoamento Profissional  
ABOPR – Ponta Grossa

**2004-2006** Pós-graduação em Periodontia – Nível de Mestrado  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo - USP

**2008-2011** Pós-graduação em Odontologia – Nível de Doutorado  
Faculdade de Odontologia de Araraquara  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

**2010-2011** Pós-graduação – Doutorado “Sanduíche”  
Surface Biology Group, Department of Prosthodontics  
Faculty of Odontology, Malmö University, Suécia

## *Dedicatória*

Dedico este trabalho a minha esposa **Maria Augusta**, aos meus pais **Humberto** e **Norma**, ao meu irmão **João Paulo**, por me incentivarem e darem condições de sempre poder ir mais longe em todas as etapas da minha vida. Vocês são o meu exemplo. Obrigado pelo apoio, compreensão e inspiração.

## *Agradecimentos Especiais*

À **Prof<sup>a</sup>. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, por ter confiado em mim, e me dado a oportunidade de dividir este importante momento na minha vida profissional e pessoal. Pela paciência, apoio, respeito e carinho. Muito obrigado.

Ao **Prof. Elcio Marcantonio Junior**, por te me recebido como aluno no curso de Doutorado e compartilhado comigo seus conhecimentos, idéias e filosofias. Muito obrigado.

À **Prof<sup>a</sup>. Ann Wennerberg**, ao **Prof. Tomas Albrektsson**, e ao **Prof. Ryo Jimbo**, por toda a receptividade em minha estada na Malmö University, e por todo o apoio pessoal e profissional que ajudaram não só no desenvolvimento deste estudo, mas que serão também de grande valia no decorrer de minha vida.

Agradeço também pessoas muito importantes na minha formação que despertaram em mim a vontade de seguir a carreira acadêmica: meus professores de graduação **Elisabete Brasil dos Santos** e **Vitoldo Antonio Kozlowski Júnior**, que literalmente fizeram minha iniciação no mundo científico. E aos meus professores de graduação e especialização **Gibson Luiz Pilatti**, **Fábio André dos Santos** e **Fábio Anibal Goiris**.

Aos professores da Disciplina de Periodontia da FORP-USP: **Arthur Belém Novaes Júnior**, **Daniela Bazan Palioto**, **Márcio Fernando**



**de Moraes Grisi, Mário Taba Júnior, Sérgio Luís Scombatti de Souza,** por terem papel importante na minha formação durante o curso de mestrado. Muito obrigado.

Ao meu eterno orientador **Paulo Tambasco de Oliveira** e meu amigo **Roger Rodrigo Fernandes**, pela amizade, dedicação e apoio. Muito obrigado.

À **Regina Lúcia**, pela atenção, disposição e cordialidade. Muito obrigado.

Aos amigos **Ana Carolina Morandini, Carlos Eduardo Repeke, Erivan Schnaider Ramos Jr, Guilherme de Oliveira, João Antônio Chaves de Souza, Lucas Amaral Fontanari, Pedro Souza, Rafael Faeda, Rafael Sartori, Ricardo Andrés Landazuri, Rubens Spin Neto e Wagner Nunes de Paula**, que diariamente dividiram comigo tudo aquilo que somente um pós-graduando sabe o que é, e que tornaram esses anos especiais. Obrigado pela força!

Agradeço a toda minha família e amigos que, mesmo distantes, nunca deixaram de marcar presença em minha vida durante esses anos. Muito obrigado a todos.

## *Agradecimentos*

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla, e Vice-Diretora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Montandon Barreto.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação, pela formação e exemplo.

Aos amigos e Docentes da Disciplina de Periodontia, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana Regina Perez Orrico, pela formação e orientação.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, Regina Lúcia, Cláudia, D. Maria do Rosário, Maria José (Zezé) e Esther, cujo trabalho, dedicação e compreensão possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela paciência e admirável interesse em nos ajudar. E aos demais funcionários e colegas do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia.

Aos amigos do curso de Pós-graduação, Ana Lúcia (Naná), Andrés, Rubão, Marina, Roberta, Rodrigo, Sabrina, Shelon, Wagner e Yeon, pela amizade e inesquecíveis momentos de convivência.

À Neodent, pela doação dos discos e implantes de titânio utilizados, possibilitando a realização deste trabalho científico.

À CAPES e a FAPESP, pelo apoio financeiro concedido, indispensável para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para a execução deste trabalho.

# SUMÁRIO

<b>Resumo</b> _____	<b>13</b>
<b>Abstract</b> _____	<b>14</b>
<b>1 Introdução</b> _____	<b>15</b>
<b>2 Revisão de literatura</b> _____	<b>20</b>
Capítulo de livro _____	<b>21</b>
<b>3 Proposição</b> _____	<b>29</b>
<b>4 Material e método</b> _____	<b>30</b>
<b>4.1 Obtenção das amostras de titânio</b> _____	<b>30</b>
4.1.1 Caracterização das amostras de titânio _____	<b>32</b>
<b>4.2 Estudo - Efeitos da nicotina na osteogênese in vitro sobre superfície de titânio nanoestruturada</b> _____	<b>32</b>
4.2.1 Cultura de células _____	<b>32</b>
4.2.1 Proliferação e viabilidade celular _____	<b>34</b>
4.2.2 Atividade de fosfatase alcalina _____	<b>34</b>
4.2.3 Formação de matriz mineralizada _____	<b>35</b>
<b>4.3 Estudo - Avaliação histológica da influência da inalação forçada da fumaça de cigarro na osseointegração de implantes de titânio com nanotopografia. Estudo em ratos</b> _____	<b>36</b>
4.3.1 Animais e Instalação dos implantes _____	<b>36</b>
4.3.2 Inalação Intermitente da fumaça de cigarro _____	<b>38</b>
4.3.3 Processamento e avaliação histológica _____	<b>40</b>
<b>4.4 Estudo - Avaliação da expressão de citocinas em cultura de células primárias sobre discos de titânio com nanotopografia</b> _____	<b>41</b>

4.4.1 Cultura de Células _____	41
4.4.2 Elisa _____	42
<b>4.5 Estudo - Avaliação do efeito morfológico e molecular da incorporação da laminina-1 (LN-1) em superfícies de implantes de titânio com nanotopografia_____</b>	<b>43</b>
4.5.1 Implantes e incorporação de laminina-1 _____	43
4.5.2 Animais e instalação dos implantes _____	44
4.5.3 Observação da interface dos implantes por SEM _____	45
4.5.4 Extração de RNA e Real-time RT-PCR _____	45
<b>4.6 Análise estatística _____</b>	<b>46</b>
<b>5 Resultado_____</b>	<b>48</b>
Artigo 1 _____	49
Artigo 2 _____	68
Artigo 3 _____	87
Artigo 4 _____	105
<b>6 Considerações finais _____</b>	<b>126</b>
<b>7 Conclusão _____</b>	<b>135</b>
<b>8 Referências _____</b>	<b>136</b>
<b>Anexo _____</b>	<b>148</b>

Schwartz-Filho HO. Osteogênese sobre titânio com nanotopografia. [tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## **Resumo**

Os objetivos deste estudo foram avaliar a influência da nanotopografia de superfícies de titânio no processo de osteogênese por meio de avaliação histológica do contato osso-implante, em ratos, sob efeito da inalação forçada da fumaça de cigarro; Avaliar a osteogênese e a expressão de citocinas em cultura de células primárias sobre discos de titânio com nanotopografia; E avaliar o efeito morfológico e molecular da incorporação da laminina-1 (LN-1) em superfícies com nanotopografia, em coelhos. Implantes e discos de titânio foram especialmente produzidos e submetidos a diferentes métodos para a obtenção de superfícies: usinada, micro e nanotopografia. As superfícies foram devidamente caracterizadas quanto a sua topografia, morfologia e química. Os resultados mostraram que: a nanotopografia é capaz de aumentar o contato osso-implante (BIC) mesmo na presença da inalação intermitente da fumaça de cigarro, e foi capaz de reduzir, porém não totalmente, seus efeitos deletérios e uma menor formação óssea; A nanotopografia de titânio pode ter papel importante no processo de mineralização da matriz extracelular e na modulação da expressão de citocinas; E que a incorporação de LN-1 a superfície de titânio com nanotopografia demonstrou favorecer uma maior expressão de importantes genes envolvidos na cascata da osseointegração.

**Palavras-chave:** Implantes dentários; Osteogênese; Nanotopografia.

Schwartz-Filho HO. Osteogenesis on nanotopography titanium surfaces. [tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

### **Abstract**

The aims of this study were to evaluate the influence of nanotopography of titanium surfaces in the process of osteogenesis by means of histological assessment of bone-implant contact, in rats, under the effect of forced inhalation of cigarette smoke; To assess the osteogenesis process and the expression of cytokines in primary cell culture on titanium disks with nanotopography; And evaluate morphological and molecular the effect of incorporation of laminin-1 (LN-1) surfaces with nanotopography, in rabbits. Implants and titanium disks were specially produced and submitted to different methods for obtaining surfaces with turned, micro and nanotopography. The surfaces have been properly characterized as its topography, morphology and chemistry. The results showed that: nanotopography is able to increase bone-implant contact (BIC) even in the presence of intermittent inhalation of cigarette smoke, and was able to reduce, although not entirely, their harmful effects and a lower bone formation; Nanotopography may play a important role in mineralization process and in cytokine expression.; And the incorporation of LN-1 on titanium surface with nanotopography favor a higher expression of important genes involved in the cascade of osseointegration.

**Keywords:** Dental implants; Osteogenesis; Nanotopography.

## 1 Introdução

Os implantes osseointegrados são extremamente bem sucedidos na reabilitação oral, o que é confirmado pelas altas taxas de sucesso encontradas na literatura<sup>1, 7, 22, 47, 55</sup>. Sendo assim, o tratamento com implantes é comumente eleito pelos clínicos para restaurar a dentição perdida. No entanto, embora sendo uma opção de tratamento bem estabelecida, ainda existem casos de insucesso, que podem ser causados por inúmeros fatores, tais como aqueles relacionados ao estado do paciente (por exemplo, estado de saúde geral, quantidade e qualidade do osso e manutenção da higiene oral); as características do implante (por exemplo, dimensões, revestimento, e carga); estabilidade primária; posição do implante e experiência clínica<sup>2, 19, 53</sup>.

Nos últimos anos a busca por um aumento na integração osso-implante e uma formação óssea mais rápida tem priorizado a atenção para alterações nas superfícies dos implantes. Diversas técnicas são usadas para o desenvolvimento das superfícies dos implantes. Essas diferentes superfícies têm sido testadas em diferentes modelos experimentais in vivo, in vitro e em humanos, e os resultados mostram que alterações na superfície podem favorecer acelerando<sup>15</sup> e aumentando o contato osso-implante<sup>73</sup>.

A osseointegração dos implantes requer o recrutamento de células precursoras de osteoblastos, sua ancoragem, adesão, espraiamento,



proliferação, e diferenciação em osteoblastos que produzem matriz extracelular calcificada sobre a superfície de titânio<sup>54, 61</sup>. Esses eventos celulares são altamente sensíveis ao microambiente. Fatores sistêmicos e locais estão associados com efeitos negativos no tecido ósseo<sup>4, 67</sup>. Modificações na superfície de implantes têm sido realizadas para melhorar a qualidade e a taxa de osseointegração. Foi demonstrado que a micro e a nanotopografia afetam a adesão celular, migração, proliferação, diferenciação, expressão de RNAm, síntese e secreção protéica, que pode ter um efeito benéfico sobre a formação da interface osso-implante<sup>32, 45, 50, 60</sup>.

Fatores locais e condições sistêmicas são capazes de interferir na formação e manutenção da osseointegração<sup>19</sup>. O fumo é um dos fatores relacionados à falha dos implantes<sup>3, 18, 24, 37</sup>. Não há dúvida a respeito do impacto negativo do hábito de fumar na saúde. O cigarro está associado a uma significativa redução no potencial de reparação dos tecidos da cavidade oral após procedimentos cirúrgicos<sup>38</sup>, com a doença periodontal<sup>23</sup>, além de se constituir em um importante fator nas alterações dos tecidos periimplantares<sup>74</sup>. Diversos estudos em modelo animal analisaram, através de métodos histológicos, o efeito do fumo/nicotina na interface osso/implante<sup>5, 8, 9, 44, 63</sup> demonstrando, como resultado, um menor contato osso-implante<sup>9, 44</sup>.

A possibilidade de modificações de superfície compensarem os danos causados pelo fumo e melhorarem a osseointegração foi estudada, demonstrando que, usando implantes com microtopografia em tíbias de ratos, o contato osso implante foi aumentado quando comparado com uma superfície usinada, no entanto, foi incapaz de compensar os efeitos nocivos do fumo. Embora a microtopografia não tenha apresentado os resultados esperados, a alteração topográfica para superar os efeitos deletérios do fumo ainda é um importante tema, uma vez que relatos recentes sugerem que a nanotopografia é um fator decisivo para a osseointegração<sup>28, 32</sup>. No entanto, ainda existe dúvida a respeito de como a nanotopografia poderia influenciar o processo de osteogênese na presença do fumo.

Outro tópico pouco abordado a respeito do estudo das superfícies é a resposta inflamatória aos biomateriais, que se faz um importante fator no processo de reparo e formação óssea ao redor dos implantes<sup>52</sup>, controlando o processo de inflamação, reparação e regeneração, através da sinalizações celular<sup>49</sup>. A topografia está diretamente relacionada com o comportamento de vários tipos de células, incluindo fibroblastos gengivais, que são responsáveis pela produção do tecido conjuntivo rico em colágeno ao redor de implantes dentários<sup>34, 36</sup>. Espessura e aderência do tecido conjuntivo aos implantes são determinantes e afetam eventos como: resposta inflamatória, remodelação do tecido, formação e

manutenção do espaço biológico e reabsorção óssea ao redor de implantes<sup>21, 48, 72</sup>.

Além disso, foi demonstrado que a topografia possui um papel importante na regulação dos eventos inflamatórios<sup>35, 48</sup>. Também é sabido que a topografia é capaz de influenciar a resposta de fibroblastos in vitro, e pode induzir benefícios clínicos no início do processo de reparação, melhora na adesão dos tecidos moles, e redução da reabsorção óssea marginal<sup>72</sup>. Contudo o papel da topografia de titânio nos eventos inflamatórios avaliando a resposta dos fibroblastos gengivais humanos pelo padrão de liberação de citocinas ainda não é bem compreendida.

As alterações nas superfícies dos implantes podem causar modificações em diferentes aspectos como: topografia, energia, química, molhamento ou uma associação dessas<sup>28, 71</sup>. Essas variações são capazes de influenciar a adesão celular, migração, proliferação, expressão de RNAm, síntese e secreção protéica<sup>32, 45, 50, 60</sup>. E é baseado nas conclusões extraídas desses estudos que a incorporação de proteínas às superfícies dos implantes tem sido o mais recente alvo das pesquisas.

A cascata osseointegração começa imediatamente após o implante ter sido inserido no tecido ósseo, onde o sangue se espalha de forma contígua a superfície do implante. Independentemente do biomaterial, topografia da superfície, ou molhabilidade da superfície, o contato inicial

com o sangue atrai proteínas rapidamente<sup>66</sup>, o que determina o início do processo de formação óssea<sup>30, 58</sup>. Na verdade, adsorção de proteínas à superfície do implante tem sido sugerida como de grande importância para a fase de osteocondução da osseointegração<sup>51, 56</sup>. Além disso, estudos têm investigado o significado deste fenômeno<sup>29, 31, 59</sup>, onde se tem observado que algumas proteínas melhoram significativamente a migração, a adesão, a proliferação e a diferenciação celular sobre a superfície do implante<sup>31</sup>.

A laminina-1 (LN-1) é uma glicoproteína heterotrimérica única que contém a sequência ácido arginina-glicina-aspártico (RGD)<sup>64</sup>. RGD é um receptor ligante da integrina, que é comumente encontrada nas proteínas da matriz extracelular<sup>69</sup>. Tem sido relatado que, quando aplicada em superfícies de implantes, a modificação com a sequência de RGD impregnado melhora significativamente a osseointegração<sup>36, 65</sup>, e supostamente regula a adesão dos osteoblastos através dos mecanismos de mediação das integrinas<sup>33</sup>. A adição de LN-1 poderia aumentar a resposta osteogênica nos estágios iniciais da osseointegração.

Frente a isso, fica nítida a necessidade de esclarecermos o comportamento biológico referente à osseointegração na presença de um fator deletério como a exposição ao cigarro, referente ao processo de osteogênese e a expressão de citocinas inflamatórias, e referente à incorporação da proteína laminina-1 à superfície de titânio.

## **2 Revisão de literatura**

A revisão de literatura desta Tese é apresentada como parte de um capítulo de livro:

**Capítulo de livro** - Schwartz-Filho HO, Spin-Neto R, Conte-Neto N, Del Barrio RA , Marcantonio E Jr. Evolução dos implantes dentários. In: Avanços em Periodontia e Implantodontia - paradigmas e desafios. Tunes UR, Dourado M, Bittencourt S. Nova Odessa: Editora Napoleão; 2011. p. 272-305.

## capítulo 11

# EVOLUÇÃO DOS IMPLANTES DENTÁRIOS

▶ Humberto Osvaldo Schwartz Filho ▶ Rubens Spin-Neto ▶ Nicolau Conte Neto ▶ Elcio Marcantonio Jr  
▶ Ricardo Andrés Landázuri-Del Barrio

Desde a descoberta da osseointegração por Brånemark e, contemporaneamente, por Schroeder e Schulte, a instalação de implantes de titânio tem se tornado o tratamento recomendado para a reposição de dentes perdidos<sup>(1)</sup>. Estima-se que foram instalados cerca de 2,5 milhões de implantes dentários no Brasil em 2010, com expectativa de dobrar esse número em 3 anos. Além disso, implantes de titânio são empregados também no campo da Ortopedia, por exemplo, em próteses ortopédicas e faciais.

O tratamento com implantes melhora a qualidade de vida dos pacientes<sup>(2)</sup>. Em geral, os implantes dentários têm um índice de sucesso de 90-98% em um período de 20 anos<sup>(3,4)</sup>. Entretanto, a abordagem em pacientes comprometidos ou com uma qualidade óssea desfavorável pode demandar implantes com designs e superfícies específicas e/ou técnicas cirúrgicas apropriadas que aumentem a chance de sucesso do tratamento. As complicações que ocorrem em relação aos implantes, como perda de implantes, reabsorção óssea e processos infecciosos, ilustram bem uma área que necessita de mais pesquisas buscando contornar tais problemas. O aprimoramento da técnica e desenvolvimento de novas tecnologias ganha ainda maior importância devido ao grande número de pacientes que são submetidos a esse tipo de tratamento todos os dias.

O campo dos implantes orais é um exemplo claro da importante relação entre pesquisa e indústria, sendo os achados em laboratórios frequentemente aplicados na clínica diária. A maioria dos novos designs e novas superfícies não é muito diferente do que já está sendo utilizado, e o processo para a comercialização e o início da utilização na clínica diária é relativamente rápido. Entretanto, a abordagem comercial irresponsável, quando a necessidade de se lançar algo novo entra em conflito com a falta de conhecimento sobre possíveis efeitos colaterais, é um problema que pode resultar em sofrimento desnecessário aos pacientes. Atualmente, o que se tem buscado com as pesquisas na área da Implantodontia é o conhecimento para desenvolver procedimentos mais rápidos, controlados e que resultem em maior conforto e previsibilidade para profissional e paciente. Todos esses aspectos devem ser considerados no desenvolvimento de novas superfícies, novos implantes e novas técnicas cirúrgicas. Este capítulo tem como objetivo abordar algumas inovações no campo da Implantodontia.

## MODIFICAÇÕES NAS SUPERFÍCIES DOS IMPLANTES

Brånemark *et al.*<sup>(5)</sup> criaram o termo osseointegração em 1977 e o definiram como “contato direto entre osso vivo e a superfície do implante com carga funcional, sem tecido mole interposto”. A integração de biomateriais ao osso, ou qualquer tecido, depende do mecanismo de reparo que envolve os processos de: hemostasia, inflamação, regeneração e remodelação. A quimiotaxia e o recrutamento celular são de crucial importância para que esse processo ocorra. Pesquisas estão sendo desenvolvidas buscando modificar esse mecanismo, para acelerar o processo e também aumentar o reparo e a integração. Um dos campos em que as pesquisas buscam meios de aperfeiçoar o processo de osseointegração é por meio das modificações de superfície de biomateriais.

Desde o início dos anos 80, a superfície tem sido considerada um dos 6 fatores importantes para a osseointegração<sup>(6)</sup>. Uma formação óssea mais rápida e mais forte durante o processo de reparação pode permitir uma carga precoce ou imediata sobre os implantes. Alguns conceitos são importantes para entendermos o papel das superfícies nesse processo. Os termos osteogênese à distância e osteogênese de contato foram definidos por Osborn e Newesely em 1980<sup>(7)</sup>, e definem o tipo de formação óssea que ocorre a partir do osso do leito receptor e o tipo que ocorre a partir da superfície do implante, respectivamente. Osteogênese de contato, ou a combinação de contato e à distância, pode ocorrer

em determinadas superfícies com características de natureza bioativa<sup>(8)</sup>. O termo bioativo indica que algo interage ou estimula um efeito em estruturas biológicas. Sugestivamente, esse termo deveria ser empregado em relação ao fenômeno, e não a um específico material ou superfície. Williams *et al.*<sup>(9)</sup> definem bioatividade como “fenômeno pelo qual um biomaterial estimula ou modula a atividade biológica”. Bioatividade pode ser a adesão bioquímica, ou a atração de certas proteínas e/ou a estimulação de células ósseas, por exemplo. Outro exemplo do processo bioativo é discutido por Davies<sup>(8)</sup>, sobre a importância da ativação plaquetária e a mineralização de osteoblastos e pré-osteoblastos através da rede de fibrina para aderir à superfície e dar início à formação da matriz osteoide, resultando na formação de novo osso, o que também pode ser chamado de indução óssea.

As pesquisas atuais estão focadas na expressão gênica e nos mecanismos moleculares das células envolvidas na osteogênese ao redor dos implantes. O mecanismo molecular da osseointegração, a importância das células progenitoras mesenquimais e das células hematopoiéticas (plaquetas, neutrófilos, células endoteliais, monócitos, linfócitos e osteoclastos) e os fatores de crescimento que iniciam outros eventos celulares são discutidos<sup>(10)</sup>. 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 várias

cascatas intercelulares. A multifuncionalidade de diversas moléculas envolvidas na cascata do reparo revela a complexidade do sistema biológico e também o fato de não termos o completo entendimento do mecanismo<sup>(11)</sup>. 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, por meio disso, ligar-se a certos complexos com sequência RGD que contém proteínas (ex., fibronectina) ou outros com receptores celulares depositados sobre superfícies<sup>(12-15)</sup>. O possível mecanismo que afeta a osseointegração é via componentes celulares e por meios físico-químicos<sup>(16)</sup>. Em ordem de modular a resposta, entender a natureza dos eventos que ocorrem é de grande importância.

## O TITÂNIO E A OSSEOINTEGRAÇÃO

O titânio comercialmente puro (ASTM F67, grau 1-4) é composto de 98,9-99,5% de titânio. As diferenças entre os graus são devidas ao conteúdo de impurezas (carbono, nitrogênio, ferro, hidrogênio e oxigênio). Para melhorar as propriedades mecânicas, ligas são utilizadas e têm se mostrado biocompatíveis. Ti-6Al-4V é a liga mais comumente utilizada no campo biomédico e também pode ser chamada de titânio grau 5<sup>(17)</sup>. A razão mais importante por trás do titânio ser o padrão-ouro para a osseointegração é a camada de óxido de titânio (cerca de 2-7 nm de espessura) estabelecida imediatamente no momento em que entra em contato com o oxigênio. A camada de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) oferece uma permanente e estável resistência à corrosão, dando a camada externa característica que a torna biocompatível<sup>(18)</sup>.

Alguns estudos indicam resposta semelhante das ligas e do titânio comercialmente puro, embora outros tenham indicado uma menor resposta óssea das ligas<sup>(19)</sup>. Originalmente, o conceito Brånemark estritamente utilizava titânio grau 1 para os implantes, mas, nos dias de hoje, a maioria dos implantes comercializados é feito de titânio comercialmente puro grau 4, e alguns de ligas de titânio (grau 5). O que temos que ter em mente é que as características das superfícies resultantes do processo de obtenção podem ter diferenças entre os diferentes graus de titânio, pois possuem diferentes propriedades mecânicas e químicas.

A interação primária entre o implante e o hospedeiro ocorre por meio da adsorção de moléculas de água e íons, seguidos pelas proteínas do plasma sanguíneo. O titânio e as 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, em sua maior parte, é similar à apatita<sup>(20)</sup>. Mais que isso, íons geralmente modulam a adesão de proteínas, e o Ca<sup>2+</sup> extracelular é conhecido por ligar proteínas ao TiO<sub>2</sub><sup>(21,22)</sup>. A parte dos implantes em contato com o osso interage com as proteínas do plasma, por exemplo, fibrinogênio, albumina e imunoglobulina G<sup>(21,23)</sup>. Albumina é sugerida como a proteína salivar adsorvida sobre as superfícies de titânio<sup>(24)</sup>.

Geralmente, as proteínas adsorvidas sobre as superfícies são unidas firmemente ou estão cobertas por outras proteínas. A adsorção de proteínas pode, em adição, ser alterada pelas características das superfícies, como a topografia<sup>(23)</sup> e as propriedades físico-químicas<sup>(25)</sup>. Possivelmente, uma proteína com a sequência RGD poderia ser liberada para expressar sua sequência RGD para o tecido adjacente após ter sido adsorvida a uma superfície com a intenção de promover a adesão celular. Sugeriu-se, inclusive, que a química de superfície aumenta a atividade biológica, como a ligação de integrinas, fibronectina, proteínas, resultando em um aumento da adesão celular<sup>(26)</sup>.

## MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE SUPERFÍCIES

Existe um grande número de métodos para modificações de superfícies e a maioria dos estudos comparam superfícies “usinadas” com superfícies com “novas topografias”. No entanto, não está claro, em geral, qual tipo de modificação é o melhor. Para aumentar a dificuldade de comparações em alguns tratamentos para alterar a topografia, não só a topografia é alterada, mas também a química da superfície; assim como alterações químicas também podem modificar a topografia. Albrektsson e Wennerberg<sup>(27)</sup> sugerem uma classificação para as superfícies baseada nas medidas de rugosidades. Os autores classificam as superfícies quanto a rugosidades em: superfície lisa (S<sub>a</sub> < 0,5 μm), superfície com rugosidade mínima (S<sub>a</sub> 0,5-1 μm); superfície com rugosidade moderada (Sa 1-2 μm) e superfície rugosa (S<sub>a</sub> > 2 μm), sendo S<sub>a</sub> a média aritmética da rugosidade.

## TRATAMENTOS FÍSICOS

### ► Processo de torneamento

O processo de torneamento dos implantes é frequentemente usado para a obtenção do macrodesign do implante, que pode, depois, ser modificado. Superfícies torneadas podem ter diferentes características de rugosidades, mas comumente são lisas (S<sub>a</sub> < 0,5 μm) ou minimamente rugosas (S<sub>a</sub> 0,5-1 μm) e são obtidas sem nenhum processamento adicional. O implante inicialmente proposto por Brånemark era minimamente rugoso. Hoje, acompanhamentos de mais de 20 anos são relatados em estudos clínicos de sucesso com esses implantes<sup>(4)</sup>.

### ► Jateamento abrasivo

O processo de jateamento pode originar inúmeras superfícies de diferentes rugosidades e química, dependendo de qual partícula é usada no processo (TiO<sub>2</sub> e Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> são as mais comuns), do tamanho delas, da pressão e da distância do aparelho de jateamento. Existem superfícies comerciais somente jateadas (TiOblast™, Astra Tech) ou em combinação com outros processamentos (por exemplo OsseoSpeed™, Astra Tech, e SLA®/SLActive®, Straumann). A maioria das superfícies jateadas possui uma rugosidade mínima a moderada (S<sub>a</sub> 1-2 μm)<sup>(28)</sup>.

### ► Irradiação ultravioleta de superfícies cristalinas de TiO<sub>2</sub>

Tratando uma superfície cristalina com irradiação ultravioleta, a decomposição de compostos orgânicos ocorre, e obtém-se uma superfície extremamente limpa. Mais que isso, a interação do oxigênio com moléculas de água forma grupos hidroxila com característica hidrofílica na camada mais externa da superfície<sup>(29)</sup>. A superfície precisa ser cristalina para responder ao tratamento da maneira desejada. Após o processamento, a superfície, além de se tornar altamente hidrofílica, também adquire características anfílicas, ou seja, com moléculas que possuem em sua estrutura duas partes de polaridades diferentes associadas, podendo, por meio disso, atrair diferentes proteínas de diferentes regiões. Tratamentos químicos específicos podem, em adição, ser aplicados a essas superfícies e influenciar os efeitos fotocatalíticos<sup>(30)</sup>. A topografia da superfície depende da superfície original, rugosidades mínimas e moderadas têm sido investigadas na literatura<sup>(30-32)</sup>.

### ► Ablação a laser

A tecnologia de ablação a laser para alteração de superfícies possui inúmeras aplicações industriais. Superfícies podem ter sua topografia alterada pelo processo de ablação por meio de uma fonte de laser de alta potência (CO<sub>2</sub>, Nd-Yag ou Nd-glass). O processo rápido de fusão e solidificação cria diferentes rugosidades e porosidades sobre as superfícies. Esse processo tem como resultado a formação de uma fina camada de óxido e favorece propriedades das superfícies como a dureza e a resistência à corrosão. A camada de TiO<sub>2</sub> formada sobre a superfície favorece a adesão de apatita graças à alta afinidade química que existe entre TiO<sub>2</sub> e hidroxiapatita<sup>(33,34)</sup>. Os efeitos biológicos indicam que o tratamento por ablação pode gerar superfícies que influenciam a adesão e crescimento celular<sup>(35-37)</sup>, e, em coelhos, mostram resultados de torque de remoção superiores à superfície usinada<sup>(38)</sup>.



## TRATAMENTOS ELETROQUÍMICOS

### ► Oxidação anódica

Usando o processo eletroquímico de oxidação anódica (ou anodização), a topografia da superfície e sua química podem ser alteradas<sup>(39)</sup>. Superfícies anodizadas adquirem poros irregulares, que dependem do tipo de eletrodo e também da voltagem/corrente do processo de oxidação. O processo pode ser modificado para se ter controle das rugosidades, por exemplo, criação de estruturas nanotubulares. A superfície TiUnite® (Nobel Biocare™) é anodizada e tem uma rugosidade moderada, com estruturas de diâmetro de 0,5-3 µm em geral, e apresenta íons fósforo na camada de óxido<sup>(40)</sup>, que tem cerca de 2-8 µm de espessura<sup>(41)</sup>.

## TRATAMENTOS QUÍMICOS

### ► Condicionamento ácido

Condicionar uma superfície, normalmente via processo térmico, usando ácidos que removem a camada superficial do material em geral cria superfícies com diferentes características. Comercialmente, o duplo condicionamento ácido é usado no implante OSSEOTITE® (BIOMET 3i™), que é condicionado com HCL/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>(42)</sup> e possui uma superfície minimamente rugosa<sup>(43)</sup>. As superfícies SLA®/SLActive® são primeiro jateadas e em seguida condicionadas com ácido, o que resulta em uma superfície com rugosidade moderada. A superfície OsseoSpeed™ (Astra Tech) é a superfície TiO-blast™ (Astra Tech) que passa por mais um condicionamento com ácido fluorídrico, o que resulta em uma superfície com modificação química, rugosidade moderada com estruturas nanométricas<sup>(44)</sup>.

Nanci *et al.*<sup>(45)</sup> demonstraram que usando uma solução contendo concentrações de um ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e um agente oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é possível criar de uma forma controlada nanotopografia sobre titânio e ligas de titânio. Mais que isso, demonstraram também que a superfície obtida influencia a osteogênese, modificando o processo inicial e de mineralização da matriz *in vitro*<sup>(46-48)</sup>. O tratamento químico é uma maneira versátil de gerar nanoestruturas, inclusive associado a uma microtopografia já existente<sup>(49)</sup>.

## TRATAMENTOS DE DEPOSIÇÃO

### ► Íons

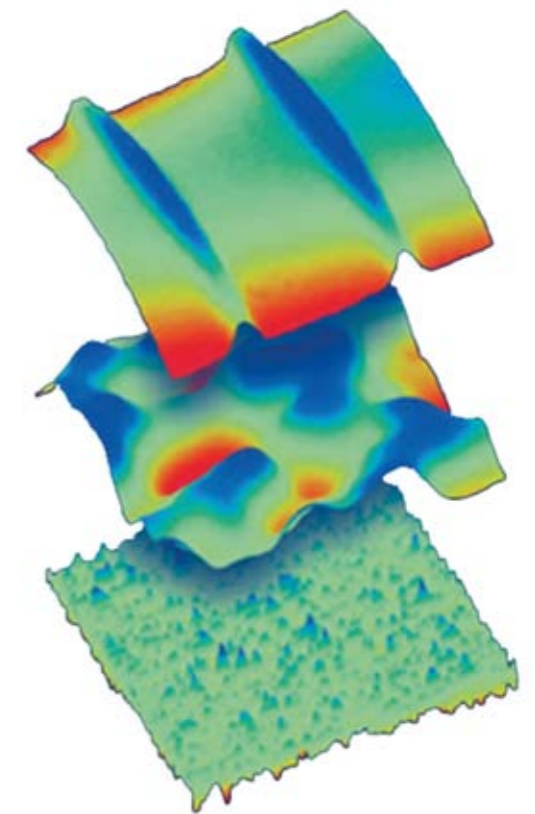
Implantação de íons envolve uma fonte iônica, um acelerador e uma câmara onde a superfície é posicionada. Quando os íons são bombardeados contra a superfície usando baixas energias, o processo é denominado *Ion Beam Deposition*. Diversos íons podem ser depositados em várias profundidades e em concentrações controladas. A deposição iônica pode ser executada sobre qualquer topografia, mas pode ter seu resultado alterado (por exemplo, depende da dureza do material)<sup>(50)</sup>.

### ► Sol-gel

É um método de via úmida que utiliza alcóxidos metálicos ou sais inorgânicos como fonte de cátions e ânions, água como agente de hidrólise e alcoóis como solventes. A tecnologia permite que seja feita preparação com sol-gel de materiais com diferentes tipos de superfície, propriedades físicas e químicas. A técnica, mais que isso, permite a deposição sobre as superfícies com controle relativamente fácil, em grande quantidade para um grande número de implantes. Uma solução é preparada com uma composição específica e frequentemente retém a fase sólida e líquida. A amostra é, depois disso, mergulhada determinado número de vezes, com um processo de secagem entre elas, e após isso aquecida para solidificar e sintetizar o recobrimento. Já se demonstrou que sol-gel pode ser modificado com grupos orgânicos funcionais<sup>(51)</sup>, podem incorporar proteínas e liberá-las de maneira controlada<sup>(52)</sup>. A técnica de uso do sol-gel é usada para obtenção de nanotopografia. Um exemplo de implantes usados comercialmente é o NanoTite® (BIOMET 3i™), que tem sua superfície tratada com uma discreta deposição de fosfato de cálcio derivada de um sol-gel.

## PROPRIEDADES DAS SUPERFÍCIES

As alterações de superfícies geram estruturas mensuráveis nas escalas de mm, µm e nm (Figura 1). O conhecimento de como essas alterações influenciam o processo de reparo *in vivo* tem se limitado à escala de mm (design do implante) e µm (rugosidade da superfície). Mudanças sobre as superfícies dos implantes na escala micrométrica podem também resultar em mudanças na escala nanométrica<sup>(28)</sup>. Várias técnicas para alteração das estruturas podem ser usadas, e o efeito de cada uma delas ainda não foi completamente avaliado. Em uma recente revisão, o grupo do professor Nanci<sup>(53)</sup> cita que as superfícies do futuro devem ser "inteligentes", e que devem responder e interagir com os estímulos dos tecidos ao seu redor. Devem "falar a mesma língua" que as células e tecidos. As superfícies com nanotopografia poderiam ser funcionalizadas com o objetivo de sinalização celular e de influenciar respostas adequadas às mudanças locais no ambiente, capazes inclusive de carregar e liberar drogas, quando estimuladas.



▲ Fig 01 – Desenho esquemático mostrando as diferenças entre macrodesign, micro e nanotopografia.

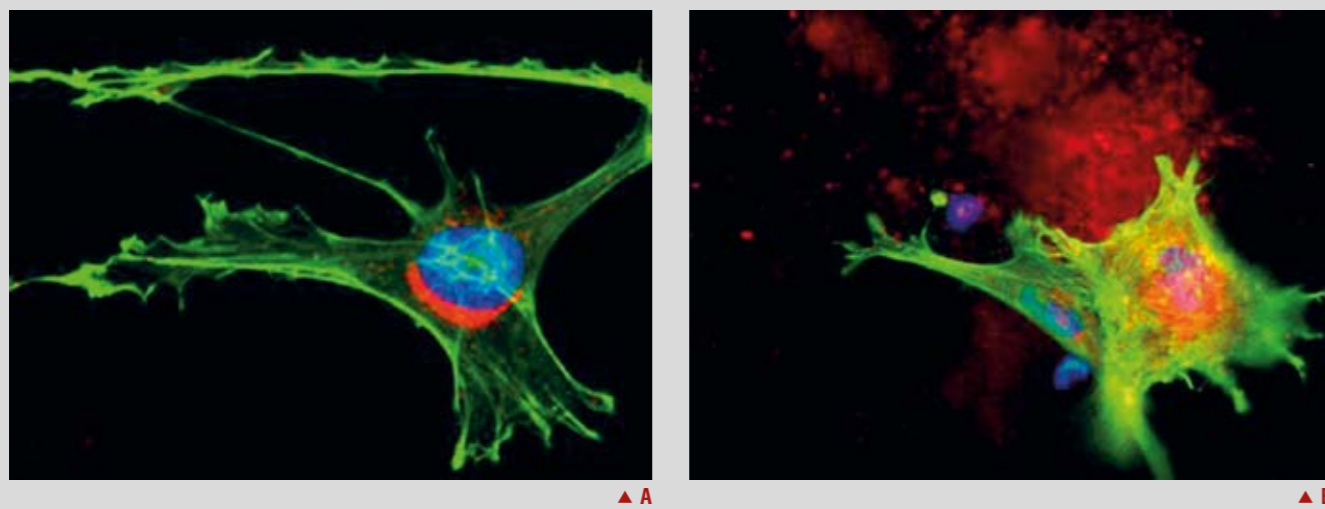


## MACRODESIGN

O implante rosqueado parafusado é, hoje, o design dominante. Entretanto, o design ideal ainda não está definido. O formato com espiras parece ser mais vantajoso que os implantes cilíndricos, por exemplo, pelo fato de ter uma melhor distribuição de cargas e uma maior área em contato direto com o osso<sup>(54)</sup>. As empresas oferecem a forma cilíndrica ou cônica, sendo que a forma e o tamanho das espiras também podem variar. Hasson<sup>(55)</sup> sugere uma melhor distribuição de forças no implantes com microespiras, o que resulta em uma menor reabsorção óssea comparado com implantes sem elas<sup>(56)</sup>. Os implantes modernos, atualmente, apresentam alto nível de sucesso, inclusive quando levamos em consideração os implantes curtos (< 10 mm)<sup>(57,58)</sup>.

## MICROTOPOGRAFIA

Como já foi comentado, Albrektsson e Wennerberg<sup>(27)</sup> sugerem que as superfícies de titânio sejam divididas em lisa (< 0,5 µm), com rugosidade mínima (0,5-1,0 µm), rugosidade moderada (1,0-1,5 µm), ou rugosa (> 2,0 µm), de acordo com o valor  $S_a$ . Segundo os estudos de Wennerberg<sup>(59)</sup>, a rugosidade moderada estimula uma forte integração óssea. No entanto, a importância dos parâmetros tem sido questionada<sup>(60)</sup>, sendo que a maioria dos implantes comerciais utilizados hoje tem superfície com rugosidade mínima ou moderada<sup>(61)</sup>. Wennerberg também propõe em sua tese que a topografia que favoreceria a formação óssea de implantes de titânio é a que possui valores de  $S_a$  1,5 µm, Sds 11,1 µm, e Sdr de 50%. *In vitro* foi descrito por Schwartz Fo *et al.*<sup>(62)</sup> que a microtopografia influencia a morfologia celular, modificando e favorecendo a mineralização da matriz óssea (Figura 2). Essas superfícies têm sido acompanhadas em estudos clínicos publicados, mostrando ter um índice de sucesso de 97% para acompanhamentos de 5 a 10 anos<sup>(63-65)</sup>.



▲ Fig 02 A,B – Imunomarcações de células osteogênicas derivadas de calvária crescidas sobre superfície usinada (A) e Plus (Dentsply Friadent, Mannheim, Alemanha) (B) em 1 dia. Fluorescência vermelha indica osteopontina (OPN). Fluorescência verde e azul indicam, respectivamente, citoesqueleto de actina, marcado com faloidina conjugada com Alexa Fluor, e núcleo celular, marcado com DAPI.

## NANOTOPOGRAFIA

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 celular<sup>(66)</sup>. A resposta óssea em modelos animais foi aumentada pela presença de nanoestruturas sobre a superfície do titânio<sup>(67,68)</sup>. Entretanto, hoje, quando discutimos nanoestruturas, é mais frequente encontrá-las sobre uma base de microtopografia; a maioria dos implantes comerciais denominados de nanotopografia (por exemplo, OsseoSpeed™, SLActive® e Nanotite) tem em sua base uma rugosidade mínima ou moderada<sup>(69)</sup>.

A relevância clínica das estruturas nanométricas ainda não é bem conhecida. Estudos *in vitro* têm demonstrado a importância dessas estruturas<sup>(46,48)</sup>. As dimensões do conceito de nanoestruturas são similares aos de microtopografia; em ambas, a distribuição e as dimensões podem ser importantes<sup>(68)</sup>. 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, e, consequentemente, quando apropriado, propiciar que o implante já seja colocado em função logo após sua instalação.

## QUÍMICA

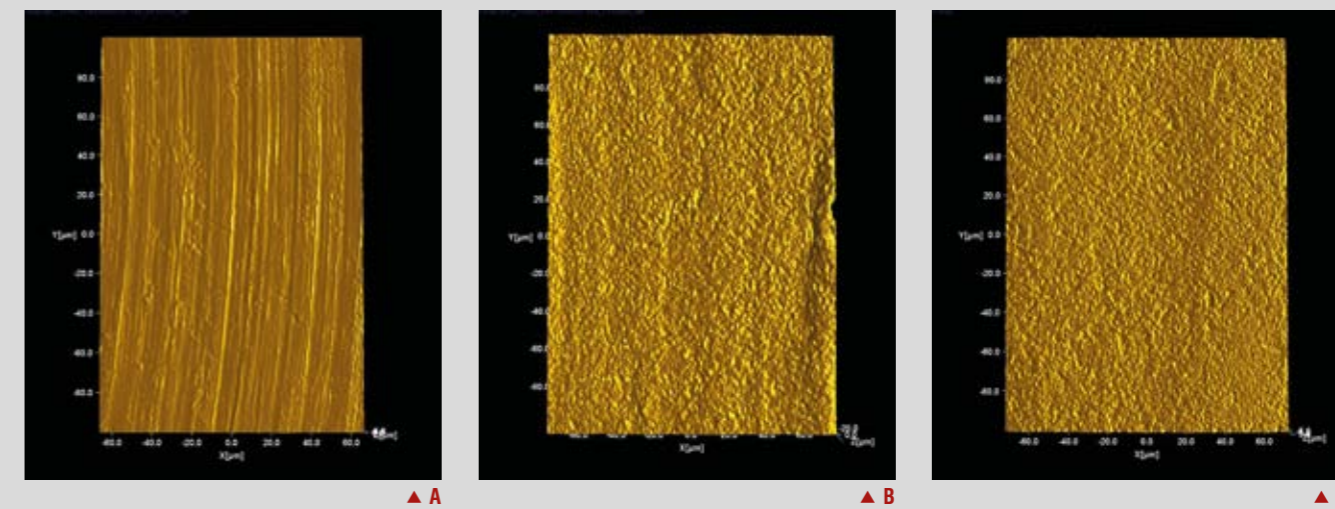
### INCORPORAÇÃO DE ÍONS:

#### ► Fósforo

Íons de fósforo podem ser encontrados na superfície TiUnite® em uma concentração de aproximadamente 2%<sup>(39)</sup>. Tratamento hidrotérmico com íons de fósforo tem resultado em maiores valores para o torque de remoção e áreas de contato osso-implante quando comparado com implantes torneados, condicionados, jateados, jateados e condicionados, ou anodizados após 6 semanas, em coelhos<sup>(70)</sup>.

#### ► Flúor

Íons de flúor têm alta afinidade com íons de cálcio e fosfato, e modificações com flúor têm mostrado estimular células ósseas mesenquimais<sup>(10,71)</sup>. O flúor aumenta a densidade óssea<sup>(72)</sup>, o que pode ser consequência do impacto nas propriedades do tecido ósseo adjacente à superfície do implante. Mais que isso, estudos *in vivo* demonstram vantagens das modificações com flúor. Aumento no contato osso-implante foi descrito em cães<sup>(73,74)</sup> e ratos<sup>(10)</sup>, somado a isso aumento na propriedade biomecânicas em coelhos avaliados por até 3 meses, em comparação com superfícies somente jateadas<sup>(75-77)</sup>.



▲ Fig 03 A-C – Imagem digital ilustrando a rugosidade de superfície na escala micrométrica, que é a escala mais usada para a avaliação de rugosidade e seu efeito no processo biológico. (A) Superfície torneada. (B) Microtopografia. (C) Nanotopografia. Imagens baseadas nas medidas feitas com interferômetro óptico.

Existe uma superfície comercial que é modificada por flúor, por meio do condicionamento com ácido hidrófluorídrico, OsseoSpeed™. Kang *et al.*<sup>(40)</sup> encontraram flúor sobre a superfície OsseoSpeed™ em uma concentração muito baixa (0,3%) quando avaliada.

#### ► Magnésio

A implementação do uso de magnésio tem sido sugerida para aumentar a nucleação de hidroxiapatita e apatita sobre o titânio. A modificação com íons de magnésio aumenta a adesão celular e regula a cascata intercelular em células humanas quando comparado com superfícies não modificadas de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e Ti6Al4V<sup>(78)</sup>, e também para células ósseas derivadas de ratos em superfícies lisas e com rugosidade moderada<sup>(79)</sup>. Superfícies de implantes com Mg<sup>2+</sup> têm também mostrado uma forte adesão óssea<sup>(80-84)</sup> e aceleração do processo de osseointegração<sup>(83,84)</sup> quando comparadas com controles. Em outro estudo, Mg<sup>2+</sup> incorporado em microtopografias promoveu aumento nos valores de frequência de ressonância em comparação com implantes disponíveis comercialmente<sup>(85)</sup>.

#### ► Cálcio

Possíveis efeitos da incorporação de Ca<sup>2+</sup> foram sugeridos. A maioria do Ca<sup>2+</sup> existente move-se entre a superfície e os fluidos extracelulares. Após interações eletrostáticas entre os íons cálcio e os íons das proteínas ósseas da matriz extracelular, eles se depositam, e os íons cálcio estimulam os receptores RGD das superfícies celulares e recrutam osteoblastos e células osteoprogenitoras<sup>(86)</sup>.

Íons cálcio podem ser depositados, por exemplo, por meio da implementação iônica, oxidação eletroquímica ou imersão plasmática. A dissolução de Ca<sup>2+</sup> tem sido sugerida como fator-chave para nucleação de hidroxiapatita em superfícies modificadas por cálcio<sup>(87)</sup>. A implantação de Ca<sup>2+</sup> acelera a adsorção de íons fosfato e aumenta a habilidade do titânio de induzir a formação de minerais cálcio e fosfato nas superfícies<sup>(87-89)</sup>, possivelmente passando a ter uma superfície com maior número de cargas positivas e mais radicais hidroxila quando comparado com o TiO<sub>2</sub> não modificado<sup>(90)</sup>.

Estudos prévios in vivo usando titânio comercialmente puro anodizado com incorporação de Ca<sup>2+</sup> mostram que a modificação de cálcio favoreceu a osseointegração<sup>(91-93)</sup>. Possivelmente, os efeitos dos íons cálcio são a atração de proteínas e fatores de crescimento importantes para as células e para a formação óssea<sup>(91-95)</sup>, que favorecem o crescimento celular<sup>(96,97)</sup> e a funcionalização como sítios de ligação para cristais de mineralização óssea<sup>(89)</sup>.

#### ► Fosfato de cálcio

Existe um grande número de fosfatos de cálcio que podem ser formados biologicamente ou obtidos de forma sintética<sup>(98)</sup>. Vários íons podem ser incorporados aos cristais de apatita, por exemplo CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> e F, o que resulta em diferentes propriedades, como, por exemplo, a solubilidade<sup>(99)</sup>. Fosfato tricálcio (beta fosfato tricálcio, forma normalmente usada como biomaterial) é um cristal rapidamente absorvido, mas em parte é convertido em hidroxiapatita estável com a correta composição de elétrons ao redor, quando envolvido por fluidos corpóreos. Beta fosfato tricálcio é também sintetizado com hidroxiapatita para ter uma taxa de degradação menor; é então chamado de fosfato de cálcio bifásico. O fosfato de octacálcio é outro precursor para a hidroxiapatita. A composição do fosfato de cálcio é importante para estabelecer o recobrimento de uma superfície<sup>(100)</sup>.

Uma possível desvantagem das apatitas é que elas interagem com o meio biológico, mas podem fraturar do corpo do material. Isso acontecia quando a hidroxiapatita era depositada usando métodos de plasma-spray<sup>(101,102)</sup>. Entretanto, usando métodos que depositam finas camadas de hidroxiapatita (sol-gel ou outros métodos), a fratura do corpo dos implantes não é mais um problema. O recobrimento de fosfato de cálcio ou hidroxiapatita tem sido sugerido para criar uma superfície com características bioativas em que a nucleação mineral ocorre sobre a superfície<sup>(99)</sup>. Existem inúmeros métodos de recobrir superfícies com cálcio; por exemplo, plasma-spray, deposição eletroforética e deposição por sol-gel. Fosfato de cálcio é comumente usado na pesquisa ortopédica<sup>(103,104)</sup>. Faeda *et al.* sugerem que implantes que tiveram sua superfície modificada com laser e foram recobertos com hidroxiapatita têm

seu processo de integração acelerado e um aumento no contato osso-implante durante os primeiros 2 meses após implantação em coelhos<sup>(105)</sup>.

#### ► Moléculas/proteínas biofuncionais

Proteínas podem também ser adsorvidas ou imobilizadas sobre as superfícies. Os desafios são manter a biofuncionalidade após sua imobilização e o controle da taxa de difusão nos tecidos. Para interação com o tecido ósseo, diferentes peptídeos<sup>(14)</sup>, colágeno<sup>(106)</sup> e BMP-2<sup>(100,107)</sup> já foram estudados. E certas modificações mostram um aumento da osteogênese<sup>(108)</sup>.

#### ► Bifosfonatos

Bifosfonatos são um tipo de medicamento sistêmico comumente utilizado para tratar condições como osteoporose, e têm um efeito inibitório sobre os osteoclastos. Bifosfonatos imobilizados sobre titânio<sup>(109)</sup>, aço inoxidável<sup>(110,111)</sup> e hidroxiapatita cobrindo titânio e ligas de titânio<sup>(112,113)</sup> têm mostrado aumento na resposta óssea em diversos estudos em ratos e cachorros. Sua aplicação é relativamente modesta e as pesquisas nessa área estão em desenvolvimento. A ação de inibição da remodelação óssea dos bifosfonatos pode ser um grande limitador para seu uso para esse fim<sup>(114)</sup>.

## CONCLUSÕES

Existem inúmeros processos de modificação de superfícies de titânio disponíveis. Muitas delas permitem o adequado controle do seu efeito, o que é fundamental para a produção de implantes comerciais. Entretanto, ainda é difícil alterar apenas uma característica específica para utilização em pesquisas uma vez que determinada modificação pode também alterar as características físico-químicas. Saber exatamente qual modificação resulta em determinada resposta é o desafio. Ainda mais porque a maioria das publicações peca na correta caracterização das superfícies. Novos estudos que monitorem com cuidado fatores como química, física e topografia e que realizem a caracterização das superfícies com as técnicas adequadas poderão concluir qual alteração, ou a combinação delas, favorece a formação óssea. Sabemos que a topografia influencia

a resposta óssea no nível micrométrico e que os estudos mostram essa influência também no nível nanométrico.

Bioatividade é um termo amplamente usado. O conceito deveria supostamente ser usado para descrever a natureza das características da superfície, no lugar de considerar uma superfície em particular. Supostamente, uma superfície bioativa possui vantagens para a osseointegração. A respeito de definições, o objetivo das superfícies com características bioativas é rápida integração, resultando em um período mais curto de reparo, e, possivelmente, uma ancoragem mais forte do implante. As seguintes modificações de superfícies resultam em superfícies com possíveis efeitos bioativos: condicionamento com flúor, oxidação anódica, incorporação de íons, hidroxiapatita e imobilização de proteínas.

A osseointegração sobre superfícies de titânio tem sido extensamente investigada, entretanto, 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 das características das superfícies estão se tornando mais comuns e vão provavelmente aumentar a possibilidade de modificarmos da maneira mais adequada de alcançar a “superfície ideal”. Essa “superfície ideal” terá propriedades que possuam efeitos desejados não apenas relacionados ao tecido ósseo, mas em relação ao tecido mole e ao bio filme.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albrektsson T; Wennerberg A. The impact of oral implants – past and future, 1966-2042. *J Can Dent Assoc* 2005 May; 71(5):327.
2. Strassburger C.; Kerschbaum T.; Heydecke G. Influence of implant and conventional prostheses on satisfaction and quality of life: A literature review. Part 2:Qualitative analysis and evaluation of the studies. *Int J Prosthodont* 2006 Jul-Aug; 19(4):339-48.
3. Lekholm U.; Grondahl K.; Jemt T. Outcome of oral implant treatment in partially edentulous jaws followed 20 years in clinical function. *Clin Implant Dent Relat Res* 2006; 8(4):178-86.
4. Ekelund J. A.; Lindquist LW.; Carlsson G. E.; Jemt T. Implant treatment in the edentulous mandible: a prospective study on Brånemark system implants over more than 20 years. *Int J Prosthodont* 2003 Nov-Dec; 16(6):602-8.
5. Brånemark P.I.; Hansson B. O.; Adell R.; Breine U.; Lindström J.; Hallen Ö. *et al.* Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1977; 16:1-132.
6. Albrektsson T; Brånemark P. I.; Hansson H. A.; Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 1981; 52(2):155-70.
7. Osborn J.; Newesely H. Dynamic aspects of the implant-bone-interface. München: Hanser; 1980.
8. Davies J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003 Aug; 67(8):932-49.
9. Williams D. F. The Williams Dictionary of Biomaterials Liverpool: Liverpool University Press; 1999.
10. Cooper L. F.; Zhou Y.; Takebe J.; Guo J.; Abron A.; Holmen A. *et al.* Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO<sub>2</sub> grit-blasted c. p. titanium endosseous implants. *Biomaterials* 2006 Feb; 27(6):926-36.
11. Athanasou N. A. Cellular biology of bone-resorbing cells. *J Bone Joint Surg Am* 1996 Jul; 78(7):1096-112.
12. Tosatti S.; Schwartz Z.; Campbell C.; Cochran D. L.; VandeVondele S.; Hubbell J. A. *et al.* RGD-containing peptide GCRGYGRGDSPPG reduces enhancement of osteoblast differentiation by poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol)-coated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2004 Mar 1; 68(3):458-72.
13. Garcia A. J.; Reyes C. D. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. *J Dent Res* 2005 May; 84(5):407-13.
14. Schliephake H.; Scharnweber D.; Dard M.; Sewing A.; Aref A.; Roesler S. Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005 Apr; 73(1):88-96.
15. Zreiqat H.; Akin F. A.; Howlett C. R.; Markovic B.; Haynes D.; Lateef S. *et al.* Differentiation of human bone-derived cells grown on GRGDSP-peptide bound titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2003 Jan 1; 64(1):105-13.
16. Pilliar R. M. Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. *Implant Dent* 1998; 7(4):305-14.
17. Freese H.; Volas M.; Wood R. Metallurgy and Technological Properties of Titanium and Titanium Alloys. In Brunette D. M.; Tengvall P.; Textor M.; Thomsen P.; editors. Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2001. p. 25-51.
18. Lausmaa J. Surface oxides on titanium: Preparation, characterization and biomaterial applications. Gothenburg: Chalmers University of Technology; 1991.
19. Palmquist A.; Lindberg F.; Emanuelsson L.; Brånemark R.; Engqvist H.; Thomsen P. Morphological studies on machined implants of commercially pure titanium and titanium alloy (Ti6Al4V) in the rabbit. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009 Oct; 91(1):309-19.
20. Hanawa T.; Ota M. Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution. *Biomaterials* 1991 Oct; 12(8):767-74.
21. Ellingsen J. E. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO<sub>2</sub>. *Biomaterials* 1991 Aug; 12(6):593-6.
22. Collis J. J.; Embery G. Adsorption of glycosaminoglycans to commercially pure titanium. *Biomaterials* 1992; 13(8):548-52.
23. Sela M. N.; Badihi L.; Rosen G.; Steinberg D.; Kohavi D. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2007 Oct; 18(5):630-8.
24. Steinberg D.; Klinger A.; Kohavi D.; Sela M. N. Adsorption of human salivary proteins to titanium powder. I. Adsorption of human salivary albumin. *Biomaterials* 1995 Nov; 16(17):1339-43.
25. MacDonald D. E.; 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 Feb; 23(4):1269-79.
26. MacDonald D. E.; Rapuano B. E.; Deo N.; Stranick M.; Somasundaran P.; Boskey A. L. Thermal and chemical modification of titanium-aluminum-vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and M. G63 cell attachment. *Biomaterials* 2004 Jul; 25(16):3135-46.
27. 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* 2004 Sep-Oct; 17(5):536-43.
28. Svanborg L. M.; Andersson M.; Wennerberg A. Surface characterization of commercial oral implants on the nanometer level. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010 Feb; 92(2):462-9.
29. Guillemot F.; Porte M. C.; Labrue C.; Baquey C. Ti4+ to Ti3+ conversion of TiO<sub>2</sub> uppermost layer by low-temperature vacuum annealing: interest for titanium biomedical applications. *Colloid Interface Sci* 2002 Nov 1; 255(1):75-8.
30. Jimbo R.; Sawase T.; Baba K.; Kurogi T.; Shibata Y.; Atsuta M. Enhanced initial cell responses to chemically modified anodized titanium. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008 Mar; 10(1):55-61.
31. Sawase T.; Jimbo R.; Baba K.; Shibata Y.; Ikeda T.; Atsuta M. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clin Oral Implants Res* 2008 May; 19(5):491-6.



32. Sawase T.; Jimbo R.; Wennerberg A.; Suketa N.; Tanaka Y.; Atsuta M. A novel characteristic of porous titanium oxide implants. *Clin Oral Implants Res* 2007 Dec; 18(6):680-5.
33. Gaggli A.; Schultes G.; Muller W. D.; Karcher H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces – a comparative study. *Biomaterials* 2000 May; 21(10):1067-73.
34. Bereznai M.; Pelsoczi I.; Toth Z.; Turzo K.; Radnai M.; Bor Z. *et al.* Surface modifications induced by ns and sub-ps excimer laser pulses on titanium implant material. *Biomaterials* 2003 Oct; 24(23):4197-203.
35. Cooper L. F. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent* 2000 Nov; 84(5):522-34.
36. Frenkel S. R.; Simon J.; Alexander H.; Dennis M.; Ricci J. L. Osseointegration on metallic implant surfaces: effects of microgeometry and growth factor treatment. *J Biomed Mater Res* 2002; 63(6):706-13.
37. Soboyejo W. O.; Nemetski B.; Allameh S.; Marcantonio N.; Mercer C.; Ricci J. Interactions between M. C3T3-E1 cells and textured Ti6Al4V surfaces. *J Biomed Mater Res* 2002 Oct; 62(1):56-72.
38. Faeda R. S.; Tavares H. S.; Sartori R.; Guastaldi A. C.; Marcantonio E.; Jr. Evaluation of titanium implants with surface modification by laser beam. Biomechanical study in rabbit tibias. *Braz Oral Res* 2009 Apr-Jun; 23(2):137-43.
39. Sul Y. T.; Johansson C. B.; Jeong Y.; Albrektsson T. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. *Med Eng Phys* 2001 Jun; 23(5):329-46.
40. Kang B. S.; Sul Y. T.; Oh S. J.; Lee H. J.; Albrektsson T. X. P. S. A ES and SEM analysis of recent dental implants. *Acta Biomater* 2009 Jul; 5(6):2222-9.
41. Palmquist A.; Omar OM.; Esposito M.; Lausmaa J.; Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface* 2010 Oct 6; 7 Suppl 5:S515-27.
42. Khang W.; Feldman S.; Hawley C. E.; Gunsolley J. A multi-center study comparing dual acid-etched and machined-surfaced implants in various bone qualities. *J Periodontol* 2001 Oct; 72(10):1384-90.
43. Wennerberg A.; Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000 May-Jun; 15(3):331-44.
44. Jarmar T.; Palmquist A.; Brånemark R.; Hermansson L.; Engqvist H.; Thomsen P. Characterization of the surface properties of commercially available dental implants using scanning electron microscopy, focused ion beam, and high-resolution transmission electron microscopy. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008 Mar; 10(1):11-22.
45. Nanci A.; Wuest J. D.; Peru L.; Brunet P.; Sharma V.; Zalzal S. *et al.* Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 1998 May; 40(2):324-35.
46. de Oliveira P. T.; Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004 Feb; 25(3):403-13.
47. Variola F.; Yi J. H.; Richert L.; Wuest J. D.; Rosei F.; Nanci A. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. *Biomaterials* 2008 Apr; 29(10):1285-98.
48. Oliveira P. T.; Zalzal S. F.; Beloti M. M.; Rosa A. L.; Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A* 2007 Mar 1; 80(3):554-64.
49. Vetrone F.; Variola F.; Tambasco de Oliveira P.; Zalzal S. F.; Yi J. H.; Sam J. *et al.* Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. *Nano Lett* 2009 Feb; 9(2):659-65.
50. Rautray T. R.; Narayanan R.; Kwon T. Y.; Kim K. H. Surface modification of titanium and titanium alloys by ion implantation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010 May; 93(2):581-91.
51. Lenza R. F.; Vasconcelos W. L.; Jones J. R.; Hench L. L. Surface-modified 3D scaffolds for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2002 Sep; 13(9):837-42.
52. Mansur H. S.; Lobato Z. P.; Orefice R. L.; Vasconcelos W. L.; Oliveira C.; Machado L. J. Surface functionalization of porous glass networks: effects on bovine serum albumin and porcine insulin immobilization. *Biomacromolecules* 2000 Winter; 1(4):789-97.
53. Variola F.; Brunski J. B.; Orsini G.; Tambasco de Oliveira P.; Wazen R.; Nanci A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale* 2010 Oct 26.
54. Carlsson L.; Rostlund T.; Albrektsson B.; Albrektsson T. Implant fixation improved by close fit. Cylindrical implant-bone interface studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1988 Jun; 59(3):272-5.
55. Hansson S. Towards the biomechanically optimized implant. *Applied Osseointegration Research* 2008; 7:5-16.
56. De Bruyn H.; Collaert B. Effect of microthread design on prevention of marginal bone loss. *Applied Osseointegration Research* 2008; 7:38-48.
57. Morand M.; Irinakis T. The challenge of implant therapy in the posterior maxilla: providing a rationale for the use of short implants. *J Oral Implantol* 2007; 33(5):257-66.
58. Raviv E.; Turcotte A.; Harel-Raviv M. Short dental implants in reduced alveolar bone height. *Quintessence Int* 2010 Jul-Aug; 41(7):575-9.
59. Wennerberg A. On Surface Roughness and Implant Incorporation. Gothenburg: University of Gothenburg; 1996.
60. Hansson S. Surface roughness parameters as predictors of anchorage strength in bone: a critical analysis. *J Biomech* 2000 Oct; 33(10):1297-303.
61. Wennerberg A.; Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010 Jan-Feb; 25(1):63-74.
62. Schwartz Fo H. O.; Novaes A. B.; Jr, de Castro L. M.; Rosa A. L.; Oliveira P. T. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res* 2007 Jun; 18(3):333-44.
63. Rasmusson L.; Roos J.; Bystedt H. A 10-year follow-up study of titanium dioxide-blasted implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; 7(1):36-42.
64. Cochran D.; Oates T.; Morton D.; Jones A.; Buser D.; Peters F. Clinical field trial examining an implant with a sand-blasted, acid-etched surface. *J Periodontol* 2007 Jun; 78(6):974-82.
65. Friberg B.; Jemt T. Clinical experience of TiUnite implants: a 5-year cross-sectional, retrospective follow-up study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2010 May; 12 Suppl 1:e95-103.
66. Mendonca G.; Mendonca D. B.; Aragao F. J.; Cooper L. F. Advancing dental implant surface technology – from micron- to nanotopography. *Biomaterials* 2008 Oct; 29(28):3822-35.
67. Meirelles L.; Arvidsson A.; Andersson M.; Kjellin P.; Albrektsson T.; Wennerberg A. Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. *J Biomed Mater Res A* 2008 Nov; 87(2):299-307.
68. Meirelles L.; Melin L.; Peltola T.; Kjellin P.; Kangasniemi I.; Currie F. *et al.* Effect of hydroxyapatite and titania nanostructures on early *in vivo* bone response. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008 Dec; 10(4):245-54.
69. Valencia S.; Gretzer C.; Cooper L. F. Surface nanofeature effects on titanium-adherent human mesenchymal stem cells. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009 Jan-Feb; 24(1):38-46.
70. Park J. W.; Jang J. H.; Lee C. S.; Hanawa T. Osteoconductivity of hydrophilic microstructured titanium implants with phosphate ion chemistry. *Acta Biomater* 2009 Jul; 5(6):2311-21.
71. Isa Z. M.; Schneider G. B.; Zaharias R.; Seabold D.; Stanford C. M. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006 Mar-Apr; 21(2):203-11.
72. Resch H.; Libanati C.; Farley S.; Bettica P.; Schulz E.; Baylink D. J. Evidence that fluoride therapy increases trabecular bone density in a peripheral skeletal site. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 Jun; 76(6):1622-4.
73. Abrahamsson I.; Albouy J. P.; Berglundh T. Healing at fluoride-modified implants placed in wide marginal defects: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2008 Feb; 19(2):153-9.
74. Berglundh T.; Abrahamsson I.; Albouy J. P.; Lindhe J. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2007 Apr; 18(2):147-52.
75. Ellingsen J. E.; Johansson C. B.; Wennerberg A.; Holmen A. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004 Sep-Oct; 19(5):659-66.
76. Meirelles L.; Currie F.; Jacobsson M.; Albrektsson T.; Wennerberg A. The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008 Jul-Aug; 23(4):641-7.
77. Monjo M.; Lamolle S. F.; Lyngstadaas S. P.; Ronold H. J.; Ellingsen J. E. *In vivo* expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implants. *Biomaterials* 2008 Oct; 29(28):3771-80.
78. Zreiqat H.; Valenzuela S. M.; Nissan B. B.; Roest R.; Knabe C.; Radlanski R. J. *et al.* The effect of surface chemistry modification of titanium alloy on signalling pathways in human osteoblasts. *Biomaterials* 2005 Dec; 26(36):7579-86.
79. Park J. W.; Kim Y. J.; Jang J. H.; Song H. Osteoblast response to magnesium ion-incorporated nanoporous titanium oxide surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2010 Nov; 21(11):1278-87.
80. Cho L. R.; Kim D. G.; Kim J. H.; Byon E. S.; Jeong Y. S.; Park C. J. Bone response of Mg ion-implanted clinical implants with the plasma source ion implantation method. *Clin Oral Implants Res* 2010 Aug; 21(8):848-56.
81. Sul Y. T.; Johansson C.; Byon E.; Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomaterials* 2005 Nov; 26(33):6720-30.
82. Sul Y. T.; Kang B. S.; Johansson C.; Um H. S.; Park C. J.; Albrektsson T. The roles of surface chemistry and topography in the strength and rate of osseointegration of titanium implants in bone. *J Biomed Mater Res A* 2009 Jun 15; 89(4):942-50.
83. Sul Y. T.; Johansson C.; Albrektsson T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. *Int J Prosthodont* 2006 Jul-Aug; 19(4):319-28.
84. Sul Y. T.; Jeong Y.; Johansson C.; Albrektsson T. Oxidized, bioactive implants are rapidly and strongly integrated in bone. Part 1 – experimental implants. *Clin Oral Implants Res* 2006 Oct; 17(5):521-6.
85. Sul Y. T.; Jonsson J.; Yoon G. S.; Johansson C. Resonance frequency measurements *in vivo* and related surface properties of magnesium-incorporated, micropatterned and magnesium-incorporated TiUnite, Osseotite, S. L. A and TiOblast implants. *Clin Oral Implants Res* 2009 Oct; 20(10):1146-55.
86. Sul Y. T. On the none response to oxidized titanium implants. Gothenburg: University of Gothenburg; 2002.
87. Huang P.; Xu K.; Han Y. Formation mechanism of biomedical apatite coatings on porous titania layer. *J Mater Sci Mater Med* 2007 Mar; 18(3):457-63.
88. Hanawa T.; Kon M.; Ukai H.; Murakami K.; Miyamoto Y.; Asaoka K. Surface modifications of titanium in calcium-ion-containing solutions. *J Biomed Mater Res* 1997 Mar 5; 34(3):273-8.
89. Ohtsu N.; Sato K.; Saito K.; Asami K.; Hanawa T. Calcium phosphates formation on CaTiO3 coated titanium. *J Mater Sci Mater Med* 2007 Jun; 18(6):1009-16.
90. Hanawa T.; Kon M.; Doi H.; Ukai H.; Murakami K.; Hamanaka H. *et al.* Amount of hydroxyl radical on calcium-ion-implanted titanium and point of zero charge of constituent oxide of the surface-modified layer. *J Mater Sci Mater Med* 1998 Feb; 9(2):89-92.
91. Sul Y. T.; Johansson C. B.; Albrektsson T. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002 Sep-Oct; 17(5):625-34.
92. Frojd V.; Franke-Stenport V.; Meirelles L.; Wennerberg A. Increased bone contact to a calcium-incorporated oxidized commercially pure titanium implant: an in-vivo study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008 Jun; 37(6):561-6.
93. Sul Y. T.; Byon E. S.; Jeong Y. Biomechanical measurements of calcium-incorporated oxidized implants in rabbit bone: effect of calcium surface chemistry of a novel implant. *Clin Implant Dent Relat Res* 2004; 6(2):101-10.
94. Nayab S. N.; Jones F. H.; Olsen I. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium. *Biomaterials* 2005 Aug; 26(23):4717-27.
95. Feng B.; Weng J.; Yang B. C.; Qu S. X.; Zhang X. D. Characterization of titanium surfaces with calcium and phosphate and osteoblast adhesion. *Biomaterials* 2004 Aug; 25(17):3421-8.
96. Nayab S. N.; Jones F. H.; Olsen I. Effects of calcium ion-implantation of titanium on bone cell function in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2007 Nov; 83(2):296-302.
97. Nayab S. N.; Jones F. H.; Olsen I. Human alveolar bone cell adhesion and growth on ion-implanted titanium. *J Biomed Mater Res A* 2004 Jun 15; 69(4):651-7.

98. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin Orthop Relat Res 1981 Jun(157):259-78.
99. LeGeros R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clin Orthop Relat Res 2002 Feb(395):81-98.
100. Schopper C.; Moser D.; Goriwoda W.; Ziya-Ghazvini F.; Spassova E.; Lagogiannis G. *et al.* The effect of three different calcium phosphate implant coatings on bone deposition and coating resorption: a long-term histological study in sheep. Clin Oral Implants Res 2005 Jun; 16(3):357-68.
101. Kangasniemi I. M.; Verheyen C. C.; Van der Velde E. A.; de Groot K. *In vivo* tensile testing of fluorapatite and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings. J Biomed Mater Res 1994 May; 28(5):563-72.
102. Collier J. P.; Surprenant V. A.; Mayor M. B.; Wrona M.; Jensen R. E.; Surprenant H. P. Loss of hydroxyapatite coating on retrieved, total hip components. J Arthroplasty 1993 Aug; 8(4):389-93.
103. Ostman P. O.; Hupalo M.; del Castillo R.; Emery R. W.; Cocchetto R.; Vincenzi G. *et al.* Immediate provisionalization of NanoTite implants in support of single-tooth and unilateral restorations: one-year interim report of a prospective, multicenter study. Clin Implant Dent Relat Res 2010 May; 12 Suppl 1:e47-55.
104. Ostman P. O.; Wennerberg A.; Albrektsson T. Immediate occlusal loading of NanoTite PREVAIL implants: a prospective 1-year clinical and radiographic study. Clin Implant Dent Relat Res 2010 Mar; 12(1):39-47.
105. Faeda R. S.; Tavares H. S.; Sartori R.; Guastaldi A. C.; Marcantonio E.; Jr. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. J Oral Maxillofac Surg 2009 Aug; 67(8):1706-15.
106. Stadlinger B.; Pilling E.; Huhle M.; Mai R.; Bierbaum S.; Scharnweber D. *et al.* Evaluation of osseointegration of dental implants coated with collagen, chondroitin sulphate and BMP-4: an animal study. Int J Oral Maxillofac Surg 2008 Jan; 37(1):54-9.
107. Wikesjo U. M.; Qahash M.; Polimeni G.; Susin C.; Shanaman R. H.; Rohrer M. D. *et al.* Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. J Clin Periodontol 2008 Nov; 35(11):1001-10.
108. Park J. W.; Lee S. G.; Choi B. J.; Suh J. Y. Effects of a cell adhesion molecule coating on the blasted surface of titanium implants on bone healing in the rabbit femur. Int J Oral Maxillofac Implants 2007 Jul-Aug; 22(4):533-41.
109. Yoshinari M.; Oda Y.; Inoue T.; Matsuzaka K.; Shimono M. Bone response to calcium phosphate-coated and bisphosphonate-immobilized titanium implants. Biomaterials 2002 Jul; 23(14):2879-85.
110. Linderback P.; Areva S.; Aspenberg P.; Tengvall P. Sol-gel derived titania coating with immobilized bisphosphonate enhances screw fixation in rat tibia. J Biomed Mater Res A 2010 Aug; 94(2):389-95.
111. Tengvall P.; Skoglund B.; Askendal A.; Aspenberg P. Surface immobilized bisphosphonate improves stainless-steel screw fixation in rats. Biomaterials 2004 May; 25(11):2133-8.
112. Peter B.; Gauthier O.; Laib S.; Bujoli B.; Guicheux J.; Janvier P. *et al.* Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. J Biomed Mater Res A 2006 Jan; 76(1):133-43.
113. Gao Y.; Zou S.; Liu X.; Bao C.; Hu J. The effect of surface immobilized bisphosphonates on the fixation of hydroxyapatite-coated titanium implants in ovariectomized rats. Biomaterials 2009 Mar; 30(9):1790-6.
114. Giro G.; Coelho P. G.; Pereira R. M.; Jorgetti V.; Marcantonio Jr. E.; Orrico S. R. The effect of oestrogen and alendronate therapies on post-menopausal bone loss around osseointegrated titanium implants. Clin Oral Implants Res 2010 Oct 13.

### **3 Proposição**

Os propósitos deste estudo foram:

1. Avaliar o comportamento da cultura celular primária de osteoblastos derivados de calvária de ratos sobre superfícies de titânio com nanotopografia na presença de nicotina.
2. Avaliar histologicamente, em ratos, a influência da inalação intermitente da fumaça de cigarro na osseointegração de implantes de titânio com nanotopografia.
3. Avaliar a expressão de citocinas em cultura celular primária de fibroblastos gengivais humanos sobre discos de titânio com nanotopografia.
4. Avaliar o efeito morfológico e molecular, em coelhos, da incorporação da laminina-1 (LN-1) em superfícies de implantes de titânio com nanotopografia.

## **4 Material e método**

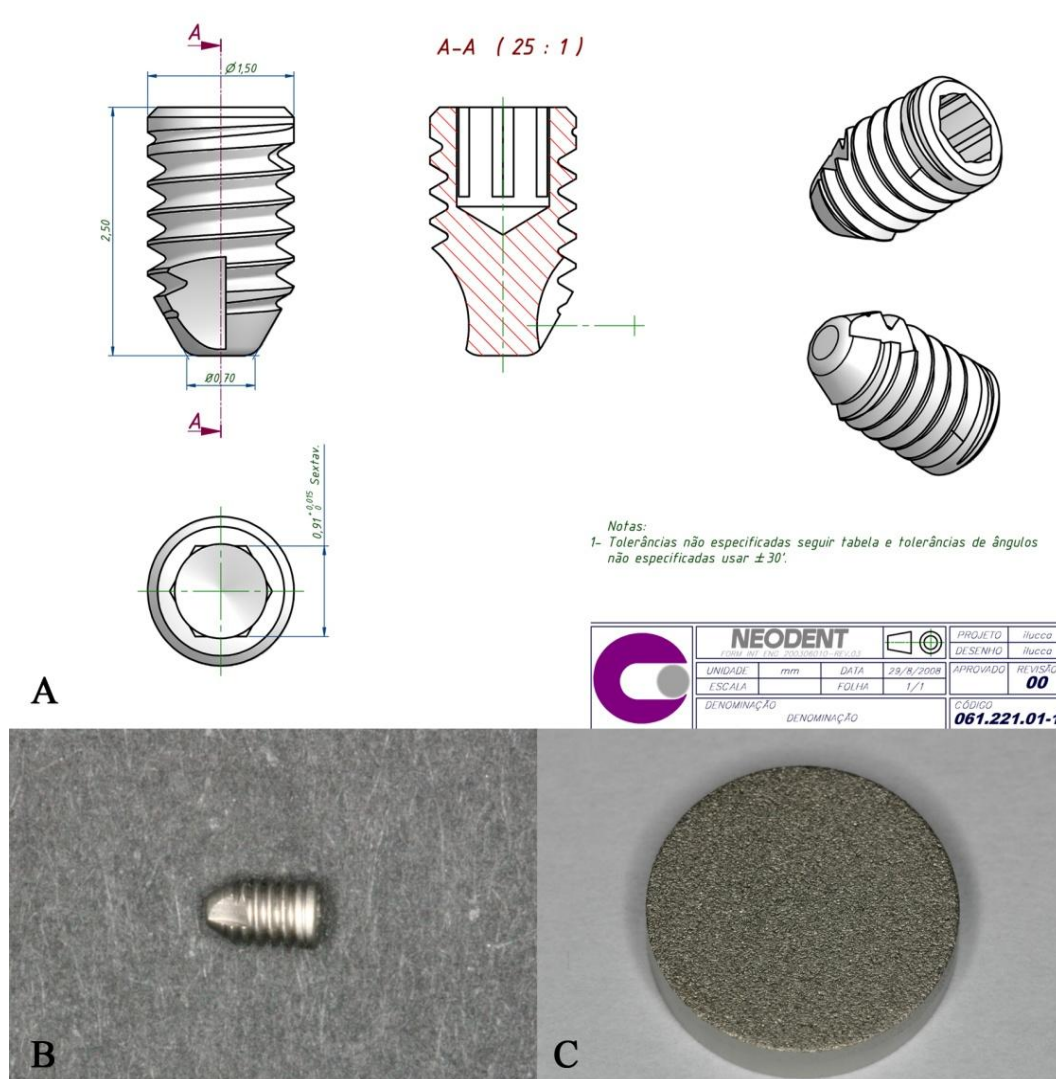
### **4.1 Obtenção das amostras de titânio**

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 para a instalação na maxila de ratos (2,5mm x 1,5mm). Foram da mesma forma cedidos pela empresa discos utilizados na cultura de células (10mm x 2mm). Figura 1.

Amostras de titânio comercialmente puro (grau 4) foram usinadas no formato de implantes ou discos, 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  $H_2O_2$  30%<sup>41</sup>.

Para os estudos de cultura celular de osteoblastos derivados de calvária de ratos e da influência da inalação intermitente da fumaça de cigarro na osseointegração, foram utilizadas as superfícies usinada, com micro e com nanotopografia. Para a avaliação da expressão de citocinas em cultura celular primária de fibroblastos gengivais humanos foram utilizadas as superfícies usinada, micro, nano e uma superfície com micro

+ nanotopografia, obtida pela combinação dos tratamentos citados. E a laminina-1 (LN-1) foi incorporada sobre a superfície com nanotopografia para a avaliação do seu efeito morfológico e molecular na osteogênese em coelhos.



**FIGURA 1** - Projeto desenvolvido para confecção dos implantes utilizados (A). Aspecto macroscópico do implante (B). Aspecto macroscópico do disco (C).



#### **4.1.1 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. Para tal foram seguidas as orientações sugeridas para a avaliação topográfica de superfícies de implantes<sup>70</sup>. 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:  $S_a$  ( $\mu\text{m}$ ), referente rugosidade média;  $S_{ds}$  ( $\mu\text{m}^{-2}$ ), referente a densidade de picos; e  $S_{dr}$  (%), referente ao aumento da área da superfície. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) (LEO 440 – Zeiss, Oberkochen, Alemanha) foi utilizada para a avaliação da morfologia das superfícies. 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.

### **4.2 Estudo - Efeitos da nicotina na osteogênese in vitro sobre superfície de titânio nanoestruturada**

#### **4.2.1 Cultura de células**

Para obtenção de células da linhagem osteoblástica, utilizamos o modelo experimental de cultura primária de calvárias de ratos recém-nascidos<sup>6, 26, 42</sup>. Todos os procedimentos estavam de acordo com o Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, número de aprovação: 19/2008 (Anexo). Células osteogênicas foram obtidas por digestão enzimática seqüencial, com solução de tripsina e colagenase em PBS, de fragmentos de calvárias de 10 ratos com 2 a 4 dias de vida pós-natal<sup>46</sup>. Os animais foram decapitados e em seguida tiveram suas calvárias removidas. Cuidadosamente com auxílio de uma tesoura as regiões próximas às suturas cranianas foram cortadas e eliminadas. O tecido remanescente foi então utilizado para a digestão enzimática. Foram utilizadas células isoladas na 2ª e 3ª digestão, de 15 e 25 minutos, respectivamente, uma vez que aquelas obtidas na primeira digestão, de 5 minutos, não são capazes de desenvolver formações nodulares de matriz mineralizada. As células enzimaticamente isoladas, em suspensão, foram contadas em hemocítômetro e plaqueadas na densidade de  $1,4 \times 10^4$  células/poço, em placas de poliestireno de 24 poços. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo, modificação alfa ( $\alpha$ -MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina, 5  $\mu\text{g/mL}$  de ácido ascórbico e 7 mM de beta-glicerofosfato por até 17 dias, incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar atmosférico. Essas condições experimentais, como já mencionados, favorecem a

diferenciação osteoblástica *in vitro* e a mineralização da matriz extracelular em formações nodulares, de multicamadas de células. O meio de cultura é trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura, avaliada por microscopia de fase em culturas primárias crescidas sobre poliestireno. As mesmas células também foram avaliadas na presença de 137 ng/ml de nicotina no meio de cultura celular, concentração semelhante à encontrada na dosagem sanguínea de animais<sup>9</sup>. Foram realizadas 3 culturas durante o experimento.

#### **4.2.2 Proliferação e viabilidade celular**

Nos dias 4, 7 e 11, foi realizada contagem de células pelo hemocítmetro, após tratamento das culturas primárias com solução de 1,5 ml de EDTA a 1 mM, 1,3 mg/ml de colagenase e tripsina a 0,25% em PBS, que remove as células aderidas. Para cada tempo experimental, o resultado foi expresso como o número total de células por poço (n=4). Para calcular a viabilidade celular, alíquotas das mesmas suspensões de células utilizadas para a determinação da curva de crescimento foram misturadas com o corante azul de tripan a 1% (1:1). Foi determinada, para cada tempo experimental e superfície de titânio, a porcentagem de células viáveis, não-coradas em azul.

#### **4.2.3 Atividade de fosfatase alcalina**

Nos tempos de 11 e 17 dias, a atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi medida através da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato

de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil). A absorbância foi medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 590 nm. A atividade de ALP, expressa em  $\mu\text{mol}$  de timoftaleína/h/ml, foi calculada a partir da medida do tubo padrão. Os dados foram normalizados pelos valores de proteína total dos mesmos poços utilizados para o cálculo da atividade de ALP. A absorbância foi medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 680 nm. Os valores obtidos, expressos em  $\mu\text{g/ml}$ , foram calculados com base em curva-padrão determinada a partir de albumina bovina.

#### **4.2.4 Formação de matriz mineralizada**

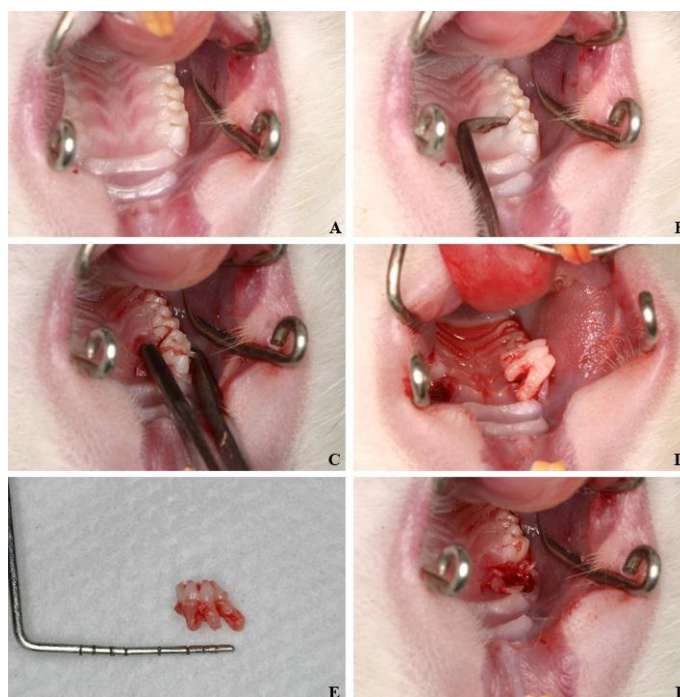
Aos 17 dias, as culturas primárias foram fixadas com solução de formalina a 10% e processadas para coloração com vermelho de Alizarina, que cora áreas de calcificação da matriz extracelular. Os poços foram fotografados e as imagens obtidas, processadas nos programas Adobe Photoshop e Image Tool (UTHSC, San Antonio, TX, EUA). Para análise quantitativa e estatística, foi determinada a porcentagem de áreas coradas em vermelho<sup>57</sup>.

### **4.3 Estudo - Avaliação histológica da influência da inalação intermitente da fumaça de cigarro na osseointegração de implantes de titânio com nanotopografia. Estudo em ratos**

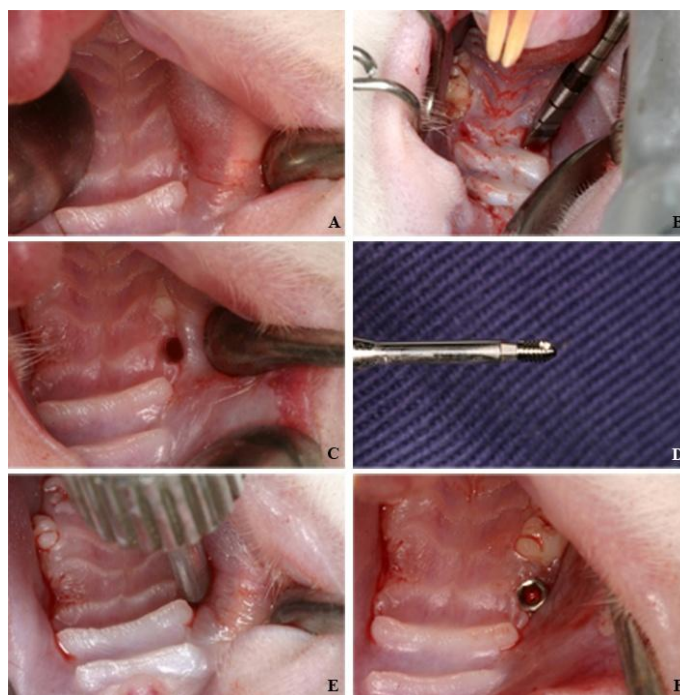
#### **4.3.1 Animais e Instalação dos implantes**

Trinta ratos Holtzman machos (peso médio, 200-300 g) foram utilizados para o estudo. Todos os procedimentos estavam de acordo com o Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, número de aprovação: 19/2008 (Anexo).

Os animais foram previamente submetidos à extração dos primeiros molares superiores (Figura 2). Após trinta dias os implantes foram instalados no lugar dos primeiros molares superiores (Figura 3). O lado e qual superfície a ser instalada foram escolhidos aleatoriamente. Anestesia geral foi realizada pela administração intramuscular de Quetamina (Quetamina Agener®; Agener União S.A. – 0,35ml/kg) e Xilazina (Dopaser® Laboratórios Calier S.A. – 0,5ml/kg). Anestesia local (Scandicaine® 2% Spécialités Septodont) foi administrada nos sítios de inserção. Após a operação os animais receberam uma dose única de antibiótico (Pentabiótico®, Wyeth-Whitehall Ltda – 0,1mg/Kg).



**FIGURA 2** - Seqüência cirúrgica do procedimento de extração dos primeiros molares superiores.

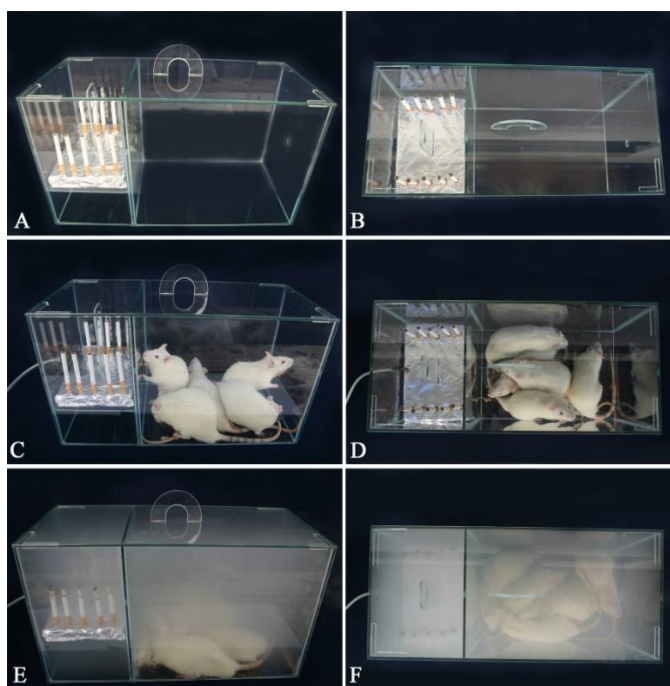


**FIGURA 3** - Seqüência cirúrgica do procedimento de instalação dos implantes.

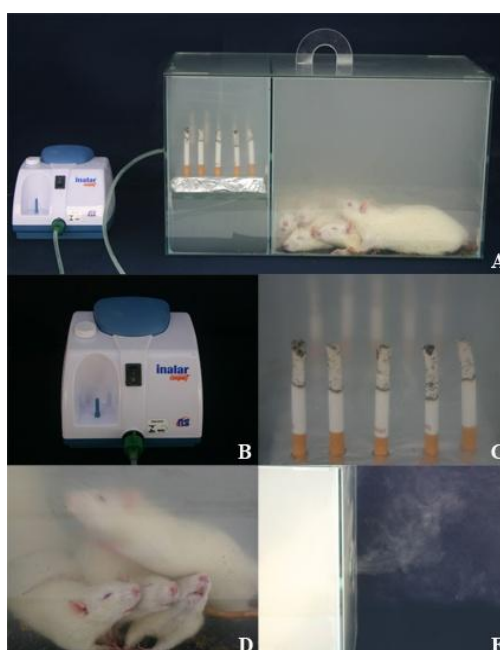
### 4.3.2 Inalação Intermitente da fumaça de cigarro

Após a instalação dos implantes os animais foram divididos em dois grupos: Grupo 1 – controle e Grupo 2 – inalação intermitente da fumaça de cigarro. Cada grupo consistiu de 15 animais, 30 implantes, 10 superfícies de cada (usinada, micro e nanotopografia). Para submeter os animais a inalação intermitente da fumaça de cigarro foi utilizada uma câmara de vidro (45 X 25 X 20 cm) com uma bomba mantendo o fluxo de entrada e saída de ar<sup>8, 12, 13, 43</sup>. O funcionamento da câmara consistia em: 5 animais eram colocados dentro da câmara de cada vez, e a fumaça de 10 cigarros (Derby, “vermelho sol” - 1,0mg de nicotina, Souza Cruz, RJ, Brasil) era bombeada para dentro da câmara. Os animais respiravam a fumaça dos cigarros por aproximadamente 8 min, 3 vezes ao dia, durante todo o período até o sacrifício 60 dias após a instalação dos implantes (Figuras 4 e 5).

Para confirmação dos níveis de nicotina/cotina no sangue dos animais foram coletadas amostras de animais expostos a fumaça e controle. As amostras foram coletadas no dia do sacrifício e encaminhadas ao laboratório responsável para avaliação através do método HPLC - *High-Pressure Liquid Chromatography*. Os resultados mostram níveis elevados tanto de nicotina como de cotina nos animais expostos a fumaça, semelhante a estudos prévios que utilizaram a mesma metodologia<sup>9, 13</sup> (Tabela 1).



**FIGURA 4** - Prancha mostrando a caixa de inalação intermitente pronta para uso sem os animais (A e B), com os animais (C e D) e em funcionamento (E e F).



**FIGURA 5** - Prancha demonstrando a caixa de inalação intermitente funcionando (A). Bomba de ar (B), cigarros acesos (C),



animais no interior da câmara (D) e fumaça saindo pela extremidade oposta (E).

**Tabela 1** - Análise dos níveis sanguíneos de nicotina e cotinina no momento do sacrifício dos animais (método *HPLC*)

	controle	exposto a fumaça 01	exposto a fumaça 02
<b>NICOTINA</b> (ng/mL)	inferior a 2,0	137,2	138,9
<b>COTININA</b> (ng/mL)	7,9	169	135

#### 4.3.3 Processamento e avaliação histológica

Todas as amostras foram preparadas para processamento histológico sem descalcificação, em micrótomo de tecidos duros (Sistema Exakt), preservando o implante no corte histológico.<sup>16</sup> A análise histomorfométrica dessas peças foi feita objetivando medir diretamente a quantidade de formação óssea ao redor dos implantes. Um corte histológico foi obtido de cada peça, da região mais central do implante, e corado com azul de Toluidina. A avaliação histomorfométrica foi realizada com base em imagens obtidas utilizando-se um microscópio de luz DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Alemanha), no aumento de 100 vezes. As imagens englobando a região das roscas dos implantes foram enviadas para um microcomputador, através de uma câmera fotográfica digital Leica Microsystems DFC-300-FX (Leica Microsystems,

Alemanha), com resolução de 1.3 megapíxels, acoplada ao microscópio de luz comum, e salvas sob a extensão TIF, permitindo que fosse avaliado o contato osso implante (BIC) ao redor do implante na forma de porcentagens.

A BIC foi medida bilateralmente nos mini-implantes instalados, levando em consideração o tecido ósseo em contato direto com a superfície do implantes. Com o objetivo de diminuir possíveis erros, devido a pequena escala dos implantes, o percentual de BIC foi obtido pela razão da extensão do tecido ósseo em contato direto com as 3 primeiras espiras do implante dentro do tecido. As avaliações histomorfométricas foram realizadas por um pesquisador treinado e calibrado, utilizando o software (UTHSCSA ImageTool® versão 3.0 - Health Science Center - Texas University - EUA) para análise de imagem.

#### **4.4 Estudo - Avaliação da expressão de citocinas em cultura de células primárias sobre discos de titânio com nanotopografia**

##### **4.4.1 Cultura de Células**

Fibroblastos gengivais humanos foram primeiramente cultivados como descrito na literatura<sup>39, 40</sup>. Resumidamente, os fibroblastos foram obtidos a partir de explantes de tecido gengival clinicamente não-inflamado recuperados a partir da margem gengival de doadores voluntários, após consentimento informado por escrito de acordo com o Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade

de São Paulo. As células foram cultivadas em Meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e antibióticos (600µl/ml de penicilina, sulfato de gentamicina 300µl/ml, e 100 µl/ml anfotericina B) incubadas a 37°C em atmosfera úmida de dióxido de carbono de 5% até confluência e foram utilizadas células entre a 4<sup>a</sup> e a 8<sup>a</sup> passagens. Para os experimentos, os fibroblastos foram semeados nas diferentes superfícies de titânio em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/poço em placas de 24 poços. Após 24 e 48 horas, o sobrenadante das células foi coletado e analisado por ensaio imunoenzimático (ELISA).

#### **4.4.2 Elisa**

Níveis extracelulares de IL-6, IL-8, TGF-β, IL-4 e IL-10 foram detectados por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, CA, EUA). Resumidamente, placas de 96 poços foram revestidas com anti-anticorpos monoclonais humanos para cada alvo. Após o bloqueio de uma hora para evitar ligações não específicas, foram colocados 100 µl do padrão de IL-6, IL-8, TGF-β, IL-4 e IL-10 e do sobrenadante da cultura. As citocinas foram detectadas por anticorpo monoclonal conjugado com monoperoxidase para cada alvo após a ligação dos anticorpos anti-humanos biotilado em cada poço. A

microplaca foi lavada para remover anticorpos não ligados marcados com a enzima.

A quantidade de peroxidase ligada a cada poço foi determinada pela adição da solução de substrato. A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de ácido sulfúrico 1 M, e as placas foram lidas a 450 nm em uma microplaca pelo leitor de ELISA (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As concentrações de citocinas foram determinadas por interpolação de uma curva padrão e apresentada como picogramas por mililitro ( $\pm$  desvio padrão) para ensaios de duplicata de amostras duplicadas de cada uma das condições testadas.

#### **4.5 Estudo - Avaliação do efeito morfológico e molecular da incorporação da laminina-1 (LN-1) em superfícies de implantes de titânio com nanotopografia**

##### **4.5.1 Implantes e incorporação de laminina-1**

Laminina-1 (L2020, Sigma-Aldrich, Stockholm, Sweden) foi diluída na concentração de 100 µg/mL em um tampão fosfato Dulbecco (DPBS) sem CaCl<sub>2</sub> ou MgCl<sub>2</sub> (14190-094; GIBCO, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA). Os implantes foram incubados na seqüência em placas de 48 poços (Nunclon Surface, Nunc, Roskilde, Dinamarca) contendo 250 µL da solução de laminina em cada poço durante 1 h em temperatura ambiente.

#### 4.5.2 Animais e Instalação dos implantes

Nove coelhos *lop-eared* do sexo masculino (média de peso corporal, 4,0 kg) foram utilizados para o estudo. Um implante teste (LN-1 revestido) e um implante controle (não-revestido) foi inserido na metáfise tibial esquerda e direita respectivamente (Figura 6 A e B). O estudo realizado em animais foi aprovado pelo comitê de ética regional Malmö / Lund, Suécia (número de aprovação: M282-09).

Antes da cirurgia, as patas traseiras eram raspadas e desinfetadas com álcool a 70% e clorexidina. Os animais foram anestesiados com injeções intramusculares de uma mistura de 0,15 medetomidina mL / kg (1 mg / mL Dormitor; Orion Pharma, Sollentuna, Suécia) e 0,35 mL de cloridrato de quetamina (50 mg / mL Ketalar; Pfizer AB, Sollentuna, Suécia ). Cloridrato de lidocaína (xilocaína; AstraZeneca AB, Södertälje, Suécia) foi administrado como o anestésico local em cada local de inserção na dose de 1 mL. Após a operação foi administrado cloridrato de buprenorfina (0,5 mL Temgesic; Reckitt Benckiser, Slough, Reino Unido) como analgésico durante 3 dias.

Depois de duas semanas, os coelhos foram sacrificados com uma overdose (60 mg / mL) de pentobarbital (Apoteksbolaget AB, Estocolmo, Suécia).

#### 4.5.3 Observação da interface dos implantes por SEM

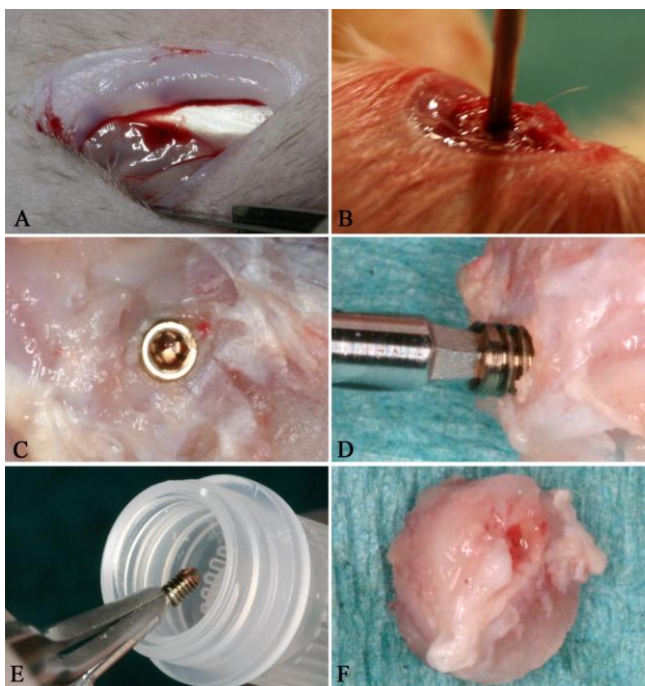
Implantes de ambos os grupos (n = 3) foram retirados da tíbia, lavados em formalina neutra tamponada 4% por 10 min, desidratados utilizando uma série crescente de etanol e secos (Figura 6 C, D e E). As amostras dos implante retiradas foram observadas usando SEM.

#### 4.5.4 Extração de RNA e Real-time RT-PCR

Para análise da expressão gênica, amostras do tecido ósseo adjacente aos implantes foram removidas com o auxílio de uma broca trefina (Figura 6 F). As amostras obtidas foram colocadas em solução *RNAlater* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) até a realização da análise. Para alcançar o RNA detectável, cada uma das 9 amostras foram agrupados em controle e teste 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 *nanodrop* (Tecnologias NanoDrop ThermoScientific, Wilmington, DE).

A quantificação em tempo real RT-PCR foi realizada sob enzima e condições padrão de ciclos em um sistema StepOne, usando ensaios e detecção SYBR® *Green* (PrimerDesign Ltd., UK). O cDNA correspondente a 6 ng de mRNA foi utilizado em cada reação de PCR, e as misturas foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante em

triplicatas 10  $\mu$ L para cada alvo de cDNA. A Amplificação foi realizada em placas de 96 poços sistema StepOne (Applied Biosystems, EUA). Os dados foram analisados usando um método comparativo StepOne™ Ct. Os níveis de expressão dos genes foram normalizados.



**FIGURA 6** - Instalação dos implantes na tíbia dos coelhos (A e B). Remoção do implante após o sacrifício (C e D). Implante removido (E) para observação usando SEM e amostra do tecido ao redor do implante removida para análise da expressão gênica (F).

#### 4.6 Análise estatística

Todos os resultados numéricos, e os dados quantitativos obtidos nas análises, foram agrupados em tabelas e avaliados estatisticamente.

Para cada um dos métodos de avaliação empregados, e para cada parâmetro avaliado, foi feita uma avaliação estatística personalizada, comparando os grupos de estudo nos diferentes períodos observacionais. Os fatores utilizados na escolha do teste estatístico empregado para a avaliação de cada um desses parâmetros foram o tipo de comparação que foi feita (pareada ou múltipla) e a avaliação da normalidade dos dados.



## 5 Resultado

Os resultados desta Tese são apresentados e discutidos em quatro artigos descritos a seguir:

**Artigo 1** - Schwartz-Filho HO, de Oliveira PT, Jimbo R, Wennerberg A, Marcantonio Jr E & Marcantonio RAC. Efeitos da nicotina na osteogênese in vitro sobre superfície de titânio nanoestruturada. Artigo em preparação, em setembro de 2011.

**Artigo 2** - Schwartz-Filho HO, Jimbo R, de Oliveira GJPL, Marcantonio Jr E, Albrektsson T, Wennerberg A & Marcantonio RAC. Effects of smoke inhalation on osteogenesis adjacent to nanostructured titanium surface. Adaptação às normas para envio à Clin Implant Dent Rel Res, em setembro de 2011.

**Artigo 3** - Schwartz-Filho HS, Morandini ACF, Ramos-Junior ES, Jimbo R, Santos CF, Marcantonio Jr E, Wennerberg A & Marcantonio RAC. Cytokine production by gingival fibroblasts on titanium surfaces with micro and nanotopography. Adaptação às normas para envio à J Biomed Mater Res A, em setembro de 2011.

**Artigo 4** - Schwartz-Filho HO, Bougas K, Xue Y, Hayashi M, Faeda RS, Marcantonio RAC, Mustafa K, Jimbo R & Wennerberg A. The early effect of laminin-1 doped nano-roughened implant surfaces: A gene expression and morphological evaluation. Submetido à J Biomed Mater Res B Appl Biomater, em agosto de 2011.

**Efeitos da nicotina na osteogênese *in vitro* sobre superfície de titânio nanoestruturada.**

Humberto Osvaldo Schwartz-Filho<sup>1,2</sup>, Paulo Tambasco de Oliveira<sup>3</sup>, Ryo Jimbo<sup>2,4</sup>, Ann Wennerberg<sup>2,4</sup>, Elcio Marcantonio Junior<sup>1</sup>, & Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio<sup>1</sup>

1 Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – UNESP Araraquara, SP, Brasil

2 Surface Biology Group, Department of Prosthodontics, Faculty of Odontology, Malmö University, Suécia

3 Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, Brasil

4 Department of Biomaterials, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Suécia

Correspondência: Humberto Osvaldo Schwartz Filho

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – UNESP

Araraquara, SP, Brasil

Fax: + 55 16 3301-6369

Fone: + 55 16 3301-6376

E-mail: betoschwartz@hotmail.com

## RESUMO

O objetivo do estudo foi analisar o comportamento da cultura primária de osteoblastos derivados da calvária de ratos sobre superfícies de titânio usinada, micro e nanoestruturada na presença de nicotina na concentração sanguínea relatada em fumantes. Usando o modelo de culturas osteogênicas derivadas de calvária, os seguintes parâmetros foram avaliados: curva de crescimento e viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e formações nodulares de matriz mineralizada. Os resultados mostraram não haver diferenças significativas em relação à curva de crescimento e viabilidade celular (4, 7 e 11 dias), atividade de ALP (11 e 17 dias). Em 17 dias, culturas osteogênicas sobre a superfície nanoestruturada exibiram áreas nodulares de matriz calcificadas bem definidas, que também eram observadas sobre a superfície com microtopografia e usinada. A área total corada com vermelho de Alizarina era significativamente maior na superfície nano comparada com a usinada (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Nano > Micro > usinada). Os resultados sugerem que alterações de nanotopografia favorecem uma maior formação de matriz mineralizada *in vitro* e que a presença da nicotina, na concentração utilizada, não é capaz de prejudicar o processo de mineralização.

**Palavras-chave:** titânio, nanotopografia, cultura de células, nicotina, osteogênese, mineralização

## INTRODUÇÃO

Implantes osseointegrados são extremamente bem sucedidos na reabilitação oral<sup>1-3</sup>. Entretanto, existem fatores locais e condições sistêmicas capazes de interferir na formação e manutenção da osseointegração<sup>4</sup>. O fumo é um dos fatores relacionados à falha dos implantes<sup>5-8</sup>. Não há dúvida a respeito do impacto negativo do hábito de fumar na saúde. E o cigarro está diretamente associado com uma redução no potencial de reparação dos tecidos da cavidade oral<sup>9-11</sup>. Diversos estudos em modelo animal analisaram, através de métodos histológicos, o efeito do fumo e da nicotina na interface osso/implante<sup>12-16</sup> e demonstraram que a inalação intermitente do cigarro pode resultar em um menor contato osso-implante<sup>12,14</sup>.

O Tabaco contém uma enorme quantidade de substâncias tóxicas, e a nicotina, mais importante componente ativo<sup>17</sup>, parece ter um papel significativo nos efeitos adversos do tabaco sobre o tecido ósseo, incluindo o processo de cicatrização<sup>18</sup>. A Nicotina e seu metabólito Cotinina podem ser encontrados na saliva e no fluido gengival de fumantes<sup>19</sup>. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a nicotina pode inibir a função de diferentes células com efeitos adversos diretos em tecidos saudáveis<sup>20-22</sup>. A osseointegração dos implantes requer o recrutamento de células precursoras de osteoblastos, sua ancoragem, adesão, espraiamento, proliferação, e diferenciação em osteoblastos que produzirão matriz extracelular calcificada sobre a superfície de titânio<sup>1,2</sup>. Estes eventos celulares são altamente sensíveis ao microambiente, e fatores sistêmicos e locais do fumo/nicotina estão associados com efeitos negativos no tecido ósseo<sup>16,23</sup>.

Nos últimos anos a busca por um aumento na integração osso-implante e uma formação óssea mais rápida tem voltado a atenção para alterações nas superfícies dos

implantes. Muitas superfícies têm sido desenvolvidas usando técnicas como o jateamento de partículas, jateamento seguido de condicionamento ácido, somente condicionamento ácido, ablação a laser e incorporação de proteínas<sup>24</sup>. Estas diferentes superfícies têm sido testadas em diferentes modelos experimentais *in vivo*, *in vitro* e em humanos, e os resultados mostram que alterações na superfície podem favorecer acelerando<sup>25</sup> e aumentando o contato osso-implante<sup>26</sup>.

O efeito da alteração de superfície sobre a osseointegração na presença de fatores como o hábito de fumar ainda é uma questão pouco abordada. *In vivo* a administração de nicotina sistêmica em coelhos não mostrou diferenças significativas no contato osso-implante<sup>13</sup>. Entretanto a inalação intermitente da fumaça do cigarro pode gerar diferenças significativas, pois existem outros metabólitos presentes na fumaça do cigarro capazes de diminuir a formação óssea. O contato através da inalação intermitente em ratos provoca uma formação menor do contato osso-implante e uma formação óssea de menor qualidade ao redor do implante, quando comparado com a administração sistêmica de nicotina<sup>14</sup>. Estudos mostram que a formação óssea trabecular é menor em pacientes fumantes, e que a falha dos implantes pode ser uma consequência tardia após a aplicação de carga<sup>7</sup>. Modificações na superfície poderiam favorecer a formação óssea prevenindo ou reduzindo essa possível falha. No entanto avaliações *in vitro* e *in vivo* comparando diferentes superfícies de titânio e as suas relações com o hábito de fumar são escassas.

Não há estudos relacionando a nanotopografia e a influência da nicotina na osteogênese. Este estudo busca com avaliações *in vitro*, através de cultura de células osteoblásticas primárias, entender a relação da nanotopografia de titânio com a nicotina.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### ***Amostras e caracterização das superfícies***

As amostras foram fornecidas pela empresa Neodent (Curitiba, Paraná, Brasil). Foram utilizados discos de titânio (Grau 4) (10mm de diâmetro x 2mm de espessura) com 3 superfícies distintas: usinada, micro e nanotopografia. A microtopografia foi obtida por um processo de jateamento com partículas de óxido de alumínio, seguido de um banho ácido (propriedade comercial). A nanotopografia foi obtida pelo tratamento com volumes iguais de uma solução de  $H_2SO_4$  e de  $H_2O_2$  30%<sup>27</sup>.

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 (AFM) (Dimension 3000 SPMTM, Digital Instruments, Santa Barbara, EUA) para avaliação na escala nanométrica. O cálculo paramétrico foi realizado após a remoção de erros de forma e ondulações por um filtro Gaussiano (50 mm × 50 mm). Os seguintes parâmetros tri-dimensionais foram selecionados:  $S_a$  ( $\mu m$ ), referente à rugosidade média;  $S_{ds}$  ( $\mu m^{-2}$ ), referente a densidade de picos; e  $S_{dr}$  (%), referente ao aumento da área da superfície. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) (LEO 440 – Zeiss, Oberkochen, Alemanha) foi utilizada para a avaliação da morfologia das superfícies. 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.

### ***Cultura celular***

Células osteogênicas foram obtidas por digestão enzimática sequencial, com solução de tripsina e colagenase em PBS, de fragmentos de calvárias de 10 ratos com 2 a 4 dias de vida pós-natal<sup>31</sup>. Os procedimentos estavam de acordo com o Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

(número de aprovação: 19/2008). As células enzimaticamente isoladas, em suspensão, foram contadas em hemocitômetro e plaqueadas na densidade de  $1,4 \times 10^4$  células/poço, em placas de poliestireno de 24 poços. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo, modificação alfa ( $\alpha$ -MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina, 5  $\mu\text{g/mL}$  de ácido ascórbico e 7 mM de beta-glicerofosfato por até 17 dias, incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar atmosférico. Essas condições experimentais favorecem a diferenciação osteoblástica *in vitro* e a mineralização da matriz extracelular em formações nodulares, de multicamadas de células. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura, avaliada por microscopia de fase em culturas primárias crescidas sobre poliestireno. As mesmas células também foram avaliadas na presença de 137 ng/ml de nicotina no meio de cultura celular, concentração semelhante à encontrada na dosagem sanguínea de animais na literatura<sup>14</sup>. Foram realizadas 3 culturas durante o experimento.

#### ***Proliferação e viabilidade celulares - Determinação de curva de crescimento***

Nos dias 4, 7 e 11, foi realizada contagem de células pelo hemocitômetro, após tratamento das culturas primárias com solução de 1,5 ml de EDTA a 1 mM, 1,3 mg/ml de collagenase e tripsina a 0,25% em PBS, que remove as células aderidas. Para cada tempo experimental, o resultado foi expresso como o número total de células por poço (n=4). Para calcular a viabilidade celular, alíquotas das mesmas suspensões de células utilizadas para a determinação da curva de crescimento foram misturadas com o corante azul de tripan a 1% (1:1). Foi determinada, para cada tempo experimental e superfície de titânio, a porcentagem de células viáveis, não-coradas em azul.

#### ***Atividade de fosfatase alcalina (ALP)***

Nos tempos de 11 e 17 dias, a atividade de ALP foi medida através da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil). A absorvância foi medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 590 nm. A atividade de ALP, expressa em  $\mu\text{mol}$  de timoiftaleína/h/ml, foi calculada a partir da medida do tubo padrão. Os dados foram normalizados pelos valores de proteína total dos mesmos poços utilizados para o cálculo da atividade de ALP. A absorvância foi medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 680 nm. Os valores obtidos, expressos em  $\mu\text{g/ml}$ , foram calculados com base em curva-padrão determinada a partir de albumina bovina.

#### ***Formação de matriz mineralizada***

Aos 17 dias, as culturas primárias foram fixadas com solução de formalina a 10% e processadas para coloração com vermelho de Alizarina, que cora áreas de calcificação da matriz extracelular. Os poços foram fotografados e as imagens obtidas, processadas nos programas Adobe Photoshop e Image Tool (UTHSC, San Antonio, TX, EUA). Para análise quantitativa e estatística, foi determinada a porcentagem de áreas coradas em vermelho<sup>32</sup>.

#### ***Análise estatística***

Os resultados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para dados independentes. Quando o resultado do teste era considerado “significante” ( $p < 0,05$ ), realizava-se em seguida o teste de comparações múltiplas de Fisher. Os resultados descritos abaixo são representativos de 2 ou 3 culturas primárias distintas, dependendo do parâmetro analisado.



## **RESULTADOS**

### ***Caracterização das superfícies***

Características da topografia das superfícies foram qualitativamente avaliadas por microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (FEG-SEM) (Figura 1). A química de superfície foi estudada através de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) 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 (Figura 2). Análise topográfica foi realizada utilizando interferômetro óptico (Figura 3) e microscopia de força atômica (AFM)(Figura 4). 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 da sua rugosidade (Tabela 1).

### ***Cultura celular***

Para cada tempo experimental, o resultado do crescimento e viabilidade foi expresso como o número total de células por poço, obtendo-se a partir dos dados originais (n=4) médias aritméticas e desvios padrões, cujos valores foram utilizados para determinação da curva de crescimento. A análise estatística revelou não haver significância para as diferenças numéricas observadas na contagem de células provenientes das diferentes superfícies (Figura 5). Também não foi observada diferença significativa quanto à viabilidade celular (Figura 6) e para a atividade de ALP (Figura 7). Para mineralização uma maior porcentagem de área corada com vermelho de Alizarina pode ser observada na superfície com nanotopografia quando comparada com a superfície usinada, sem diferença quando comparado com o grupo em contato com a nicotina (Nic) (Figura 8).

## DISCUSSÃO

O sucesso do tratamento com implantes dentários já está muito bem documentado na literatura, entretanto casos de falha e perda de implantes podem ser observados<sup>4,33,34</sup>. Condições locais e sistêmicas estão diretamente envolvidas na maioria dos casos em que essas falhas são observadas<sup>35</sup>. Entre os possíveis fatores relacionados com as falhas o fumo é um dos mais abordados<sup>36</sup>. Estudos clínicos mostram que fumantes não apresentam somente altas taxas de perda de implantes, mas também uma elevada incidência de peri-implantite e perda óssea marginal<sup>37</sup>. Poucos estudos avaliam a influência das superfícies dos implantes na presença de fatores deletérios e a possibilidade de se diminuir as suas conseqüências.

Evidências que a alterações de topografia podem estimular e guiar vários processos moleculares e biológicos na osseointegração tem estimulado o desenvolvimento de diferentes superfícies de implantes<sup>38</sup>. No presente projeto foram avaliadas três diferentes superfícies: usinada, micro e nanométrica. O processo de formação de matriz mineralizada foi observado *in vitro*, e justamente com as observações já descritas foi adicionado, como fator relacionado com as possíveis falhas no processo de formação óssea, a nicotina.

Os resultados mostraram não existir diferença na química entre as superfícies estudadas. Quanto à rugosidade foi observado que as superfícies possuem uma rugosidade mínima, sendo diferenciada pela presença ou não de micro estruturas e nanoestruturas observadas com o auxílio das imagens de SEM e AFM. Os resultados obtidos indicam que no modelo *in vitro* a nanotopografia favorece a formação de áreas de matriz mineralizada, não sendo observados efeitos deletérios da presença de nicotina no meio de cultura na concentração utilizada. Estudos prévios utilizando diferentes topografias

mostraram resultados similares aos observados em cultura de osteoblastos com a adição da mesma concentração de nicotina no meio<sup>39</sup>. O fato dos estudos não abordarem superfícies com nanotopografia dificulta uma maior comparação dos resultados obtidos.

Diversos efeitos deletérios locais e sistêmicos associados com o hábito de fumar são mais do que conhecidos, o que nos leva a conclusão de que evitar o seu consumo seja a melhor forma de combatê-los. Esses resultados reforçam o pensamento que modificações nas superfícies de titânio alteraram o padrão do processo de mineralização<sup>24</sup>. Alterações de micro e a nanotopografia favorecem um maior contato osso-implante *in vivo* e uma maior formação de matriz mineralizada *in vitro*. A inalação intermitente de fumaça de cigarro prejudica a formação óssea. Entretanto, *in vitro* a nicotina, na concentração utilizada, não se mostrou capaz de prejudicar o processo de mineralização, sugerindo que outros componentes presentes na fumaça derivada da queima do cigarro, ou a combinação deles, possam prejudicar o metabolismo ósseo e o processo de osseointegração.

## **CONCLUSÃO**

Alterações de nanotopografia favorecem uma maior formação de matriz mineralizada *in vitro*. A nicotina, *in vitro*, na concentração utilizada, não se mostrou capaz de prejudicar o processo de mineralização.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de agradecer a empresa Neodent por ter fornecido gentilmente as amostras utilizadas neste estudo. Não existe conflito de interesse por parte dos autores.

## REFERENCIAS

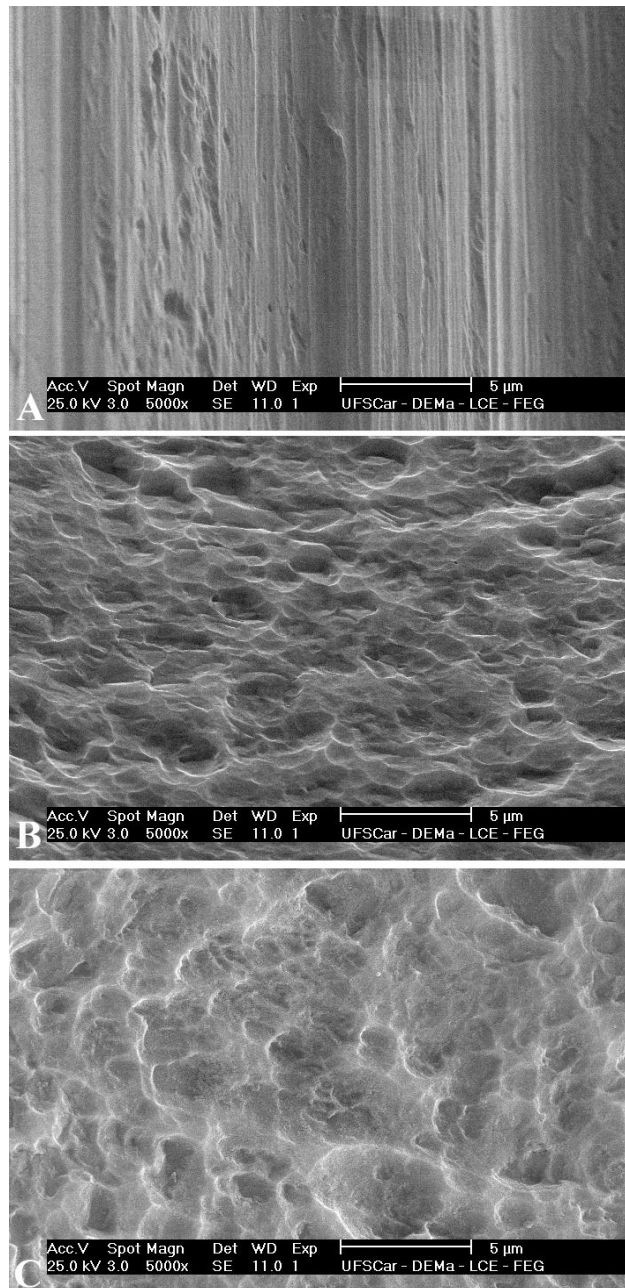
1. Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem* 1994;56(3):340-7.
2. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999;20(23-24):2311-21.
3. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(3):251-62.
4. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998;106(3):721-64.
5. Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8(6):609-15.
6. Lambert PM, Morris HF, Ochi S. The influence of smoking on 3-year clinical success of osseointegrated dental implants. *Ann Periodontol* 2000;5(1):79-89.
7. Ekfeldt A, Christiansson U, Eriksson T, Linden U, Lundqvist S, Rundcrantz T, Johansson LA, Nilner K, Billstrom C. A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(5):462-7.
8. Hinode D, Tanabe S, Yokoyama M, Fujisawa K, Yamauchi E, Miyamoto Y. Influence of smoking on osseointegrated implant failure: a meta-analysis. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(4):473-8.
9. Meechan JG, Macgregor ID, Rogers SN, Hobson RS, Bate JP, Dennison M. The effect of smoking on immediate post-extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988;26(5):402-9.
10. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol* 1993;64(1):16-23.
11. Weyant RJ. Characteristics associated with the loss and peri-implant tissue health of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9(1):95-102.
12. Nociti Junior FH, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol* 2002;73(9):982-7.
13. Stefani CM, Nogueira F, Sallum EA, de TS, Sallum AW, Nociti FH, Jr. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. *J Periodontol* 2002;73(2):206-12.

14. Cesar-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H, Jr., Nociti FH, Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol* 2003;74(10):1454-9.
15. Cesar-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20(5):713-9.
16. Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. *Clin Oral Implants Res* 2005;16(3):268-76.
17. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(4):531-41.
18. Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999;45(4):294-301.
19. McGuire JR, McQuade MJ, Rossmann JA, Garnick JJ, Sutherland DE, Scheidt MJ, Van Dyke TE. Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. *J Periodontol* 1989;60(4):176-81.
20. Giannopoulou C, Geinoz A, Cimasoni G. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol* 1999;26(1):49-55.
21. Nociti FH, Jr., Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MA, Tramontina VA, Barros SP, Sallum EA. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol* 2000;71(9):1460-4.
22. Nociti FH, Jr., Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP, Sallum EA, Sallum AW. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontol* 2001;36(6):361-6.
23. Ueng SW, Lee MY, Li AF, Lin SS, Tai CL, Shih CH. Effect of intermittent cigarette smoke inhalation on tibial lengthening: experimental study on rabbits. *J Trauma* 1997;42(2):231-8.
24. Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;25(1):63-74.
25. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998;11(5):391-401.
26. Wennerberg A. *On Surface Roughness and Implant Incorporation*. Gothenburg: University of Gothenburg; 1996.
27. Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, McKee MD. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 1998;40(2):324-35.

28. Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech* 1996;33(2):214-31.
29. Irie K, Zalzal S, Ozawa H, McKee MD, Nanci A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. *Anat Rec* 1998;252(4):554-67.
30. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 1986;38(3):143-54.
31. de Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem* 2003;51(5):633-41.
32. Rosa AL, Beloti MM. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(1):43-8.
33. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986;1(1):11-25.
34. Zarb GA, Schmitt A. The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants: the Toronto Study. Part II: The prosthetic results. *J Prosthet Dent* 1990;64(1):53-61.
35. Lemmerman KJ, Lemmerman NE. Osseointegrated dental implants in private practice: a long-term case series study. *J Periodontol* 2005;76(2):310-9.
36. De Bruyn H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res* 1994;5(4):260-4.
37. Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol* 2008;35(8 Suppl):292-304.
38. Variola F, Brunski JB, Orsini G, Tambasco de Oliveira P, Wazen R, Nanci A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale* 2010.
39. Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Gutierrez M, Fernandes MH. Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine. *Clin Oral Implants Res* 2008;19(6):582-9.

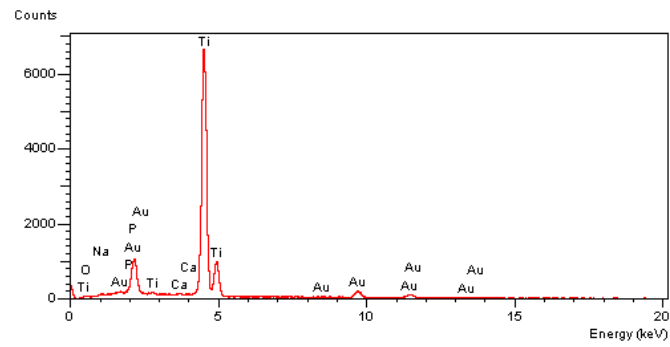
## Figura 1

Imagem SEM comparando as superfícies (A) usinada, (B) microtopografia e (C) nanotopografia.

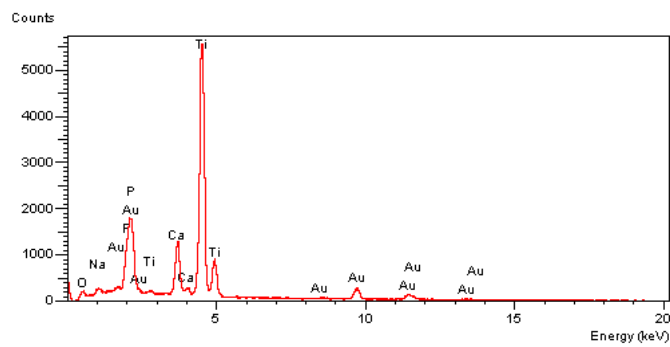


## Figura 2

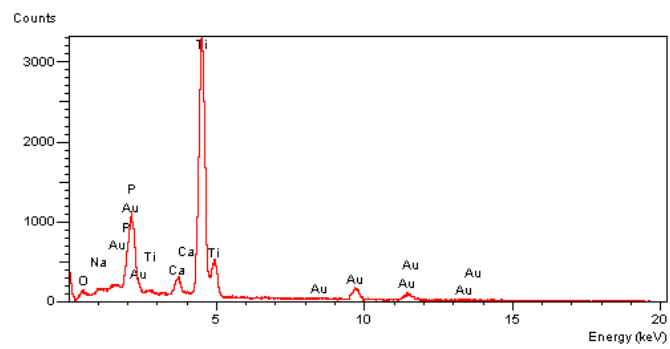
Gráficos mostrando a composição química das amostras avaliada por EDS (A) usinada, (B) microtopografia e (C) nanotopografia.



A



B

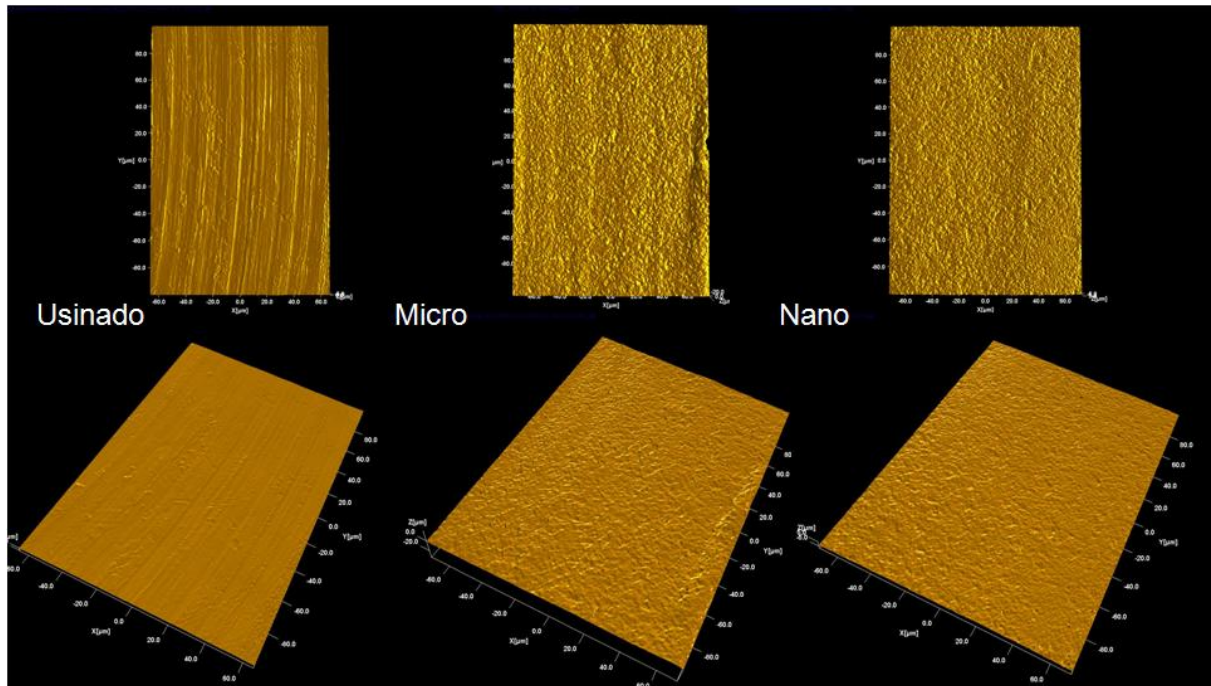


C



**Figura 3**

Imagens 3D obtidas pelo interferômetro ótico. Usinada, microtopografia e nanotopografia (Área de medida: 260mm X 200 mm).



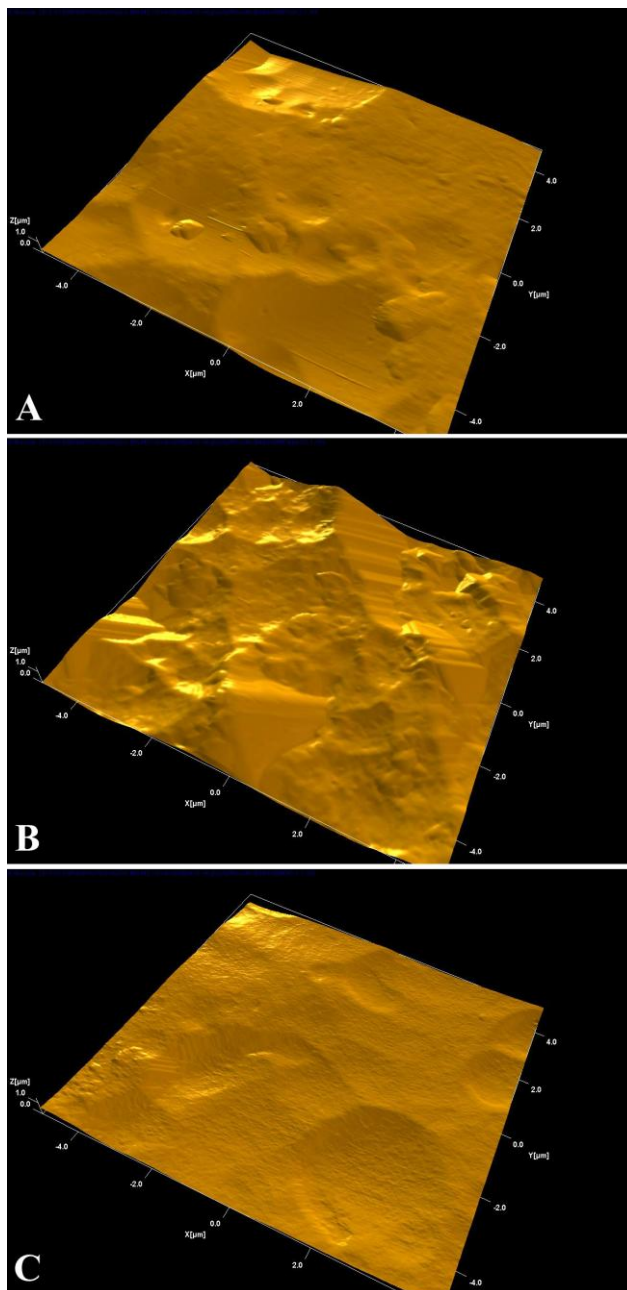
**Tabela 1**

Descrição numérica da rugosidade da superfície obtida por meio do interferômetro ótico na escala micrométrica (n=3).

	$S_a \mu\text{m}$	$S_{ds} / \text{mm}^2$	$S_{dr} \%$
Usinado	$0,28 \pm 0,2$	$148.322 \pm 29.769$	$3,40 \pm 1,47$
Micro	$0,57 \pm 0,5$	$195.900 \pm 9.838$	$10,87 \pm 1,06$
Nano	$0,27 \pm 0,7$	$195.203 \pm 7.871$	$8,15 \pm 0,53$

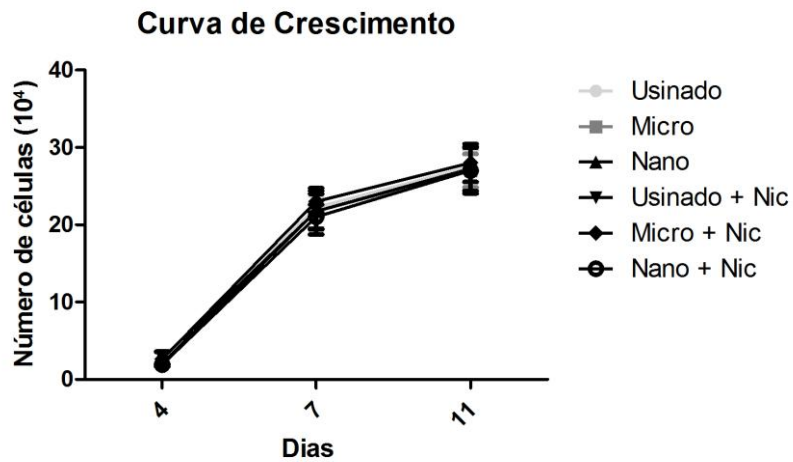
## Figura 4

Imagens 3D obtidas pelo microscópio de força atômica (AFM) (A) usinada, (B) microtopografia e (C) nanotopografia. (Área de medida: 260nm X 200 nm).



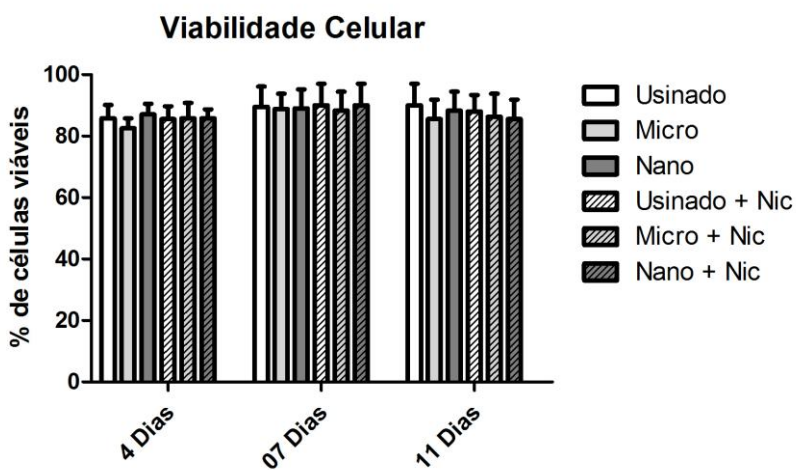
**Figura 5**

Curva de crescimento 4, 7 e 11 dias. Sem significância estatística entre os diferentes grupos, Kruskal-Wallis ( $P > 0,05$ ).



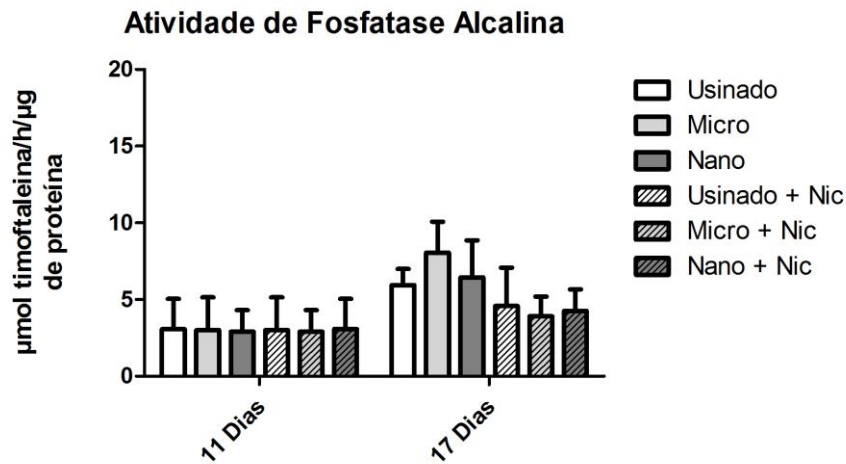
**Figura 6**

Viabilidade celular 4, 7 e 11 dias. Sem significância estatística entre os diferentes grupos, Kruskal-Wallis ( $P > 0,05$ ).



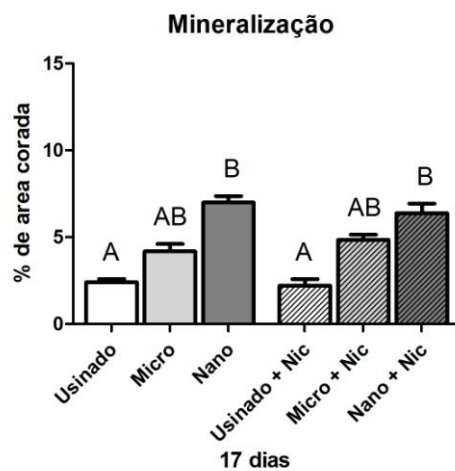
**Figura 7**

Atividade de ALP em 11 e 17 dias. Sem significância estatística entre os diferentes grupos, sem diferença entre os grupos em contato com a nicotina (Nic), Kruskal-Wallis ( $P > 0,05$ ).



**Figura 8**

Porcentagem de áreas coradas com vermelho de Alizarina em 17 dias. Porcentagem maior para a nanotopografia quando comparada a superfície usinada, sem diferença quando comparado com o grupo em contato com a nicotina (Nic), Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).



**Effects of smoke inhalation on osteogenesis adjacent to nanostructured titanium surface.**

Humberto Osvaldo Schwartz-Filho<sup>1,2</sup>, Ryo Jimbo<sup>2,3</sup>, Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira<sup>1</sup>, Elcio Marcantonio Junior<sup>1</sup>, Tomas Albrektsson<sup>3,4</sup>, Ann Wennerberg<sup>2,3</sup> & Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio<sup>1</sup>

1 Division of Periodontology, Department of Oral Diagnosis and Surgery, School of Dentistry, UNESP, São Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil

2 Surface Biology Group, Department of Prosthodontics, Faculty of Odontology, Malmö University, Sweden

3 Department of Biomaterials, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Sweden

4 Department of Dental Materials Sciences & Technology, Malmö University, Sweden

**Running title: Effects of smoke inhalation on osteogenesis on nanotopography.**

Correspondence to: Humberto Osvaldo Schwartz Filho, Division of Periodontology, Department of Oral Diagnosis and Surgery, School of Dentistry, UNESP, São Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil

Fax: + 55 16 3301-6369

Phone: + 55 16 3301-6376

E-mail: betoschwartz@hotmail.com

**Keywords:** titanium, nanotopography, smoking, osteogenesis, bone implant contact

## **ABSTRACT**

**Background:** Smoke exposure is a major factor associated with implants failure.

**Purpose:** The aim was to evaluate the effect of nanotopography on osseointegration in animals under intermittent cigarette smoke inhalation.

**Materials and Methods:** Turned, micro and nanostructured implants (Neodent, Curitiba, Brazil) were inserted into the rat maxilla. Topographical and chemical characterizations were performed by light interferometry, scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive analysis of x-ray spectroscopy (EDS). The animals received randomly implants with three different surfaces and were divided into two groups: Group 1 – control and Group 2 – submitted to cigarette smoke inhalation (CSI). After 60 days the samples were retrieved for histomorphometric evaluation of the degree of bone-to-implant contact (BIC).

**Results:** The histological results indicate that in this model micro and nanotopography favor a higher bone-implant contact in both groups compared with turned surfaces (Kruskal–Wallis test,  $P < 0.05$ ). Comparing control and CSI group, micro and nano showed better results for BIC, but with a significant decrease in CSI group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Nanotopography is able to improve BIC even in the presence of intermittent cigarette smoke inhalation; and was able to reduce, but do not totally avoid, its deleterious effects and the lower bone formation in a rat model.

## INTRODUCTION

The use of dental implants in oral rehabilitation is noted as one of the successful therapies and is corroborated by high success rates<sup>1-5</sup>. Hence, implant therapy is commonly selected when restoring the lost dentition by clinicians. However, although a well-established treatment option, there still exist implant failure cases, which may be caused by numerous factors, such as patient-related factors (*e.g.*, general patient health status, quantity and quality of bone, and oral hygiene maintenance), implant characteristics (*e.g.*, dimensions, coating, and loading), primary stability, implant position and clinician experience<sup>6-8</sup>.

Another major factor associated with implants failure is smoke consumption<sup>9-11</sup>. The negative health consequences of cigarette smoking have been well documented, and include cardiovascular disease, multiple cancers, pulmonary disease, adverse reproductive outcomes, and exacerbation of other chronic health conditions<sup>12-14</sup>. Nicotine is one of the several and harmful components, which consists in the smoke inhalation. Studies show the relation of its use with inferior clinical results in oral health<sup>15</sup>. Worst results could be associated with vascular alteration and poor bone response reflected by alteration in bone metabolism influenced by smoking<sup>16</sup>. In addition, problems in repair and post-operative complications are related with its consumption<sup>17</sup>. These alterations could be also observed in animal studies with lower bone implant contact (BIC)<sup>18</sup>. It is strongly suggested that nicotine and smoke inhalation affects the osseointegration.

Implant surface modification have been conducted to improve both the quality and rate of osseointegration. These alterations could be in topography, energy, wettability, chemistry or an association of them<sup>19, 20</sup>. It has been demonstrated that

micro and nanotopography affect cell adhesion, migration, proliferation, differentiation, gene and mRNA expression, protein synthesis and secretion, which may have a beneficial effect on interfacial tissue formation and ultimately alter bone-to-implant contact<sup>21-24</sup>.

The possibility of surface modifications to compensate for the smoke damage by enhancing osseointegration was studied by Correa *et al.*<sup>25</sup>. The authors demonstrated that, using microtopography implants in rats tibiae, BIC was increased comparing with turned surfaces, however could not compensate for the detrimental effect of tobacco smoke. Although microtopography did not present expected outcomes, the topographical alteration to overcome the effect of smoking is still an interesting topic, since recent reports suggest that nanotopography is the decisive factor for osseointegration<sup>20, 24</sup>. To our knowledge, there still lacks information regarding how nanotopography could influence the osteogenesis process under smoking conditions. Our hypothesis was that if an alteration in the nano-scale was made, it might compensate for the possible smoke damage during the osseointegration cascade. Hence, the aim of this *in vivo* study was to assess the effect of nanotopography on osseointegration using the rat maxilla under intermittent cigarette smoke inhalation to evaluate whether nanotopography can compensate for the suppressed bone responses caused by smoking.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Implants and Surface Characterization***

All implants were provided by Neodent (Curitiba, Paraná, Brazil). Commercially pure titanium (Grade 4) turned implants (length, 2mm; diameter, 1.5mm) were surface modified in order to apply different topographical features. The



surface possessing micro topography was obtained with a blasting procedure with aluminum oxide particles, followed by an acid-etching procedure (proprietary processing). The surface possessing nanotopography was obtained by treating the implants with a solution consisting of equal volumes of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 30% aqueous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as previously described<sup>26</sup>.

Topography of the implants was characterised using an interferometer (MicroXam; ADE Phase Shift Technology Inc., Tucson, AZ). The parametric calculation was performed after form errors and waviness were removed with a 50 µm × 50 µm Gaussian filter. The following three-dimensional parameters were selected: S<sub>a</sub> (µm), the arithmetic average height deviation from a mean plane; S<sub>ds</sub> (µm<sup>-2</sup>), the density of summits; and S<sub>dr</sub> (%), the developed surface ratio. Three implants from each group were randomly selected. Scanning electron microscopy (SEM) (LEO 440 – Zeiss, Oberkochen, Germany) was used for the assessment of surface morphology. To evaluate the surface chemical composition, an energy dispersive analysis of x-ray spectroscopy (EDS; LEO 440) was used.

### ***Animals and Implant Surgery***

Thirty male Holtzman rats (mean body weight, 200-300 g) were used for the study. All the procedures were in accordance with guidelines from the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Araraquara Dental School – UNESP (approval number: 19/2008).

All animals were previously submitted to the extraction of the first upper molars. Thirty days after the implants were installed in the first upper molar place. The side and which surface to be installed were chosen randomly. General anesthesia was carried out by intramuscular administration of ketamine (Quetamina Agener®);

Agener União S.A. - 0.35ml/kg,) and xylazine (Dopaser® Laboratórios Calier S.A. - 0.5ml/kg). Local anaesthetic (Scandicaine® 2% Spécialités Septodont) was administrated at each insertion site. After the operation, a single dose of antibiotic (Pentabiótico®, Wyeth-Whitehall Ltda - 0.1mg/Kg) was administered.

### ***Intermittent cigarette smoke inhalation***

Forty eight hours after implant placement the animals were divided into two groups: Group 1 – control and Group 2 – intermittent cigarette smoke inhalation. Each group consisted of 15 animals, 30 implants, 10 each surface. To submit the animals to cigarette smoke inhalation a chamber (45 X 25 X 20 cm<sup>3</sup> glass chamber, an air pump and two inflow/outflow tubes) was used like described previously<sup>18, 25, 27, 28</sup>. Briefly, the operation of the chamber consists of: five animals were housed in the chamber at the same time, and the cigarette smoke of 10 cigarettes was pumped into the chamber. Therefore, the animals breathed the cigarette smoke for approximately 8min, three times daily, during all period until sacrifice, 60 days after implants placement.

### ***Ground Section Preparation and Histological Analysis***

After 60 days, all the samples were processed for undecalcified ground sectioning. The blocks were dehydrated and the samples were embedded in light-curing resin (Technovit 7200 VLC; Heraeus Kulzer Wehrheim, Germany). Thereafter, one ground section was prepared from each implant by using an Exakt sawing and grinding equipment. The sections were ground to a final thickness of approximately 40 µm and stained with toluidine blue. Histological evaluations were performed using a light microscope (Leica Reichert & Jung products, Germany), and the histomorphometrical data were analyzed by image analysis software (Image Tool,

University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX, USA). To prevent measurements error, due to the small scale implants, the percentage of BIC was obtained by the ratio of the extent of bone in direct contact with the first tree implant threads inside bone.

### ***Statistical analysis***

Statistical analyses were carried out using the non-parametric Kruskal-Wallis test for independent samples. If the result of the Kruskal–Wallis test was ‘significant’, i.e. occurrence of at least one significant difference ( $P < 0.05$ ), the Fisher’s least significant difference multiple comparisons procedure, computed on ranks rather than data, was performed.

## **RESULTS**

### ***Implant Characterization***

The SEM images for the surface revealed different surface topographies (Figure 1). Turned surface exhibited randomly distributed grooves produced by the machining procedure. The micro surface was characterized by large pits at the micron-scale level, whereas the nano surface exhibited a distinctive nano-scale pitted topography. EDS X-ray microanalysis demonstrated that the surface chemical composition did not alter with the manufacturing processes used to create micro and nanotopographic features.

The numerical description of the surface topography, obtained by light interferometry, on the micrometer level is presented in Table 1. The 3D optical interferometry images of surface roughness are shown in Figure 2. The results shown that turned implant present low values compared with others for all evaluated

parameters.  $S_{dr}$  was significant higher for the blasted plus acid-etched procedure surface.

### ***Histomorphometry***

A few undesirable events occurred at the postoperative course. In the beginning some animals in the intermittent cigarette smoke inhalation group showed respiratory difficulties that decreased over time. Some events may be related to the sensitivity of the technique what justify few implants fail in the control group also.

The histological sections presented newly formed mineralized tissue for all groups after 60 days of healing. No difference was found in histologic morphology between groups. Newly formed bone was in close contact with the implant surface like illustrate Figure 3. The mean BIC (SD) values (n=8) for the control and cigarette smoke inhalation (CSI) groups at 60 days were: Turned 38,6% (4.9), Micro 56.0% (4.9), Nano 57.1% (4.3) and Turned CSI 22.9% (5.0), Micro CSI 40.0% (6.2), Nano CSI 41.7% (7.6). Statistical analysis revealed a significant difference regarding BIC on comparing groups and surface treatment (Figure 4). An influence of cigarette smoke inhalation was noted resulting in a lower BIC for all surfaces. The results showed higher BIC for micro and nanotopography in both groups.

### **DISCUSSION**

Evidences that topographical modifications may stimulate and enhance several molecular and biological events in the osseointegration process have further guided the development of implant surfaces in the micro and nano level<sup>29</sup>. Although satisfactory results well documented in the literature<sup>6, 30, 31</sup>, failures are observed and are related to local and systemic factors<sup>32</sup>. One of the most discussed factors

associated with fail is smoking<sup>33</sup>. Clinical studies show that smokers not only have high rates of implant loss, but also a high incidence of peri-implantitis and marginal bone loss<sup>34</sup>. Few studies have evaluated the influence of implant surfaces in the presence of deleterious factors and the possibility of observing a decrease in its consequences.

To address the effects of surface modifications, an *in vivo* rat model was used under condition of forced inhalation of cigarette smoke. A proper characterization of surfaces was performed accordingly previous described at micrometer level using a light interferometry<sup>35</sup>. Results show that all surfaces had minimal surface roughness ( $S_a < 1 \mu\text{m}$ ). SEM images show the presence of micro and nanostructures over the respective surfaces and EDS analysis did not show differences regarding the chemical composition.

To confirm the levels of nicotine / cotinine blood samples were collected from animals exposed to CSI and control. Samples were evaluated by the method HPLC - High-Pressure Liquid Chromatography (data not shown). The results showed high levels of nicotine and cotinine in animals exposed to CSI, similar to what can be found in literature in studies that used the same methodology<sup>25, 28, 36</sup>.

Osseointegration of implants requires the recruitment of osteoblast precursor cells, their anchorage, adhesion, spreading, proliferation, and differentiation in osteoblasts that produce extracellular matrix calcification on the titanium surface<sup>37, 38</sup>. These cellular events are highly sensitive to the microenvironment, and systemic and local factors of tobacco / nicotine are associated with negative effects on bone<sup>39, 40</sup>. The histological results indicate that in this model micro and nanotopography favor a higher bone-implant contact in both groups compared with turned surfaces.

Comparing control and CSI group, micro and nano showed better results, but with a significant decrease for BIC in CSI group. These decrease of BIC in CSI group reveal that micro and nano surface show similar result that turned surface in a non smoke condition. This result clearly demonstrates that surface treatment may be important reducing the deleterious effects of intermittent exposure to cigarette smoke.

Was demonstrated in a human study that smokers are at a higher risk for implant failure and peri-implant bone loss in the maxilla using implants with a fluoride-modified surface<sup>41</sup>. Previous studies using different topographies showed results similar to those observed in relation to less bone formation in animals subjected to forced inhalation of cigarette<sup>25, 42</sup>. The fact that studies address different pattern surfaces makes it difficult to compare results. Another factor that should be considered is the place of implants installation. The quality and the type of bone could be an important factor that influences the results, considering stability, cortical bone thickness, and in this case the impact of smoking on bone and surrounding tissues. However, considering the results for the microtopography and the general data such as, for example, concentration of nicotine in the blood of animals, it is evident the reproducibility of this methodology.

These results confirm that changes in the titanium surfaces altered the pattern of the mineralization process<sup>43</sup> and changes of micro and nanotopography favor a higher bone-implant contact *in vivo* even when submitted to the intermittent inhalation of cigarette smoke.

Several local and systemic deleterious effects associated with smoking are more than known, which leads us to the conclusion that avoiding consumption remains the best way to prevent them. Although the results show that the use of

surfaces with micro or nanotopography can provide a higher bone formation around implants even in the presence of smoking factor, and that the use of it in smokers patients appears to be recommended, however the results must be interpreted with great caution.

## **CONCLUSION**

It is clear that micro and nanotopography are able to improve BIC even in the presence of intermittent cigarette smoke inhalation; however they were not capable to avoid totally its deleterious effects and the lower bone formation in a rat model.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil), grant 2008/10159-9, to Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio. Humberto Osvaldo Schwartz Filho was the recipient of a PhD fellowship from The Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, PDEE program - Brazil). We would like to thank Dr. Ivete Sartori and Neodent Company for supplying the implants used in this study and Dr Rafael Silveira Faeda for SEM images and X-ray microanalysis. There were no conflicts of interest.

## **REFERENCES**

1. Bornstein MM, Schmid B, Belser UC, Lussi A, Buser D. Early loading of non-submerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. 5-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16: 631-638.
2. Glauser R, Ruhstaller P, Windisch S, et al. Immediate occlusal loading of Branemark System TiUnite implants placed predominantly in soft bone: 4-year results of a prospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; 7 Suppl 1: S52-59.
3. Rasmusson L, Roos J, Bystedt H. A 10-year follow-up study of titanium dioxide-blasted implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; 7: 36-42.

4. Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. *Periodontol 2000* 2008; 47: 15-26.
5. Ostman PO, Hellman M, Sennerby L. Immediate occlusal loading of implants in the partially edentate mandible: a prospective 1-year radiographic and 4-year clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008; 23: 315-322.
6. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 721-764.
7. Porter JA, von Fraunhofer JA. Success or failure of dental implants? A literature review with treatment considerations. *Gen Dent* 2005; 53: 423-432; quiz 433, 446.
8. Alvim-Pereira F, Montes CC, Thome G, Olandoski M, Trevilatto PC. Analysis of association of clinical aspects and vitamin D receptor gene polymorphism with dental implant loss. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19: 786-795.
9. Klokkevold PR, Han TJ. How do smoking, diabetes, and periodontitis affect outcomes of implant treatment? *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22 Suppl: 173-202.
10. Strietzel FP, Reichart PA, Kale A, Kulkarni M, Wegner B, Kuchler I. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 523-544.
11. Anner R, Grossmann Y, Anner Y, Levin L. Smoking, diabetes mellitus, periodontitis, and supportive periodontal treatment as factors associated with dental implant survival: a long-term retrospective evaluation of patients followed for up to 10 years. *Implant Dent* 2010; 19: 57-64.
12. Fielding JE. Smoking: health effects and control (1). *N Engl J Med* 1985; 313: 491-498.
13. La Vecchia C, Boyle P, Franceschi S, et al. Smoking and cancer with emphasis on Europe. *Eur J Cancer* 1991; 27: 94-104.
14. Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C, Jr., Doll R. Mortality from smoking worldwide. *Br Med Bull* 1996; 52: 12-21.
15. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64: 16-23.
16. Weyant RJ. Characteristics associated with the loss and peri-implant tissue health of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; 9: 95-102.
17. Meechan JG, Macgregor ID, Rogers SN, Hobson RS, Bate JP, Dennison M. The effect of smoking on immediate post-extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988; 26: 402-409.

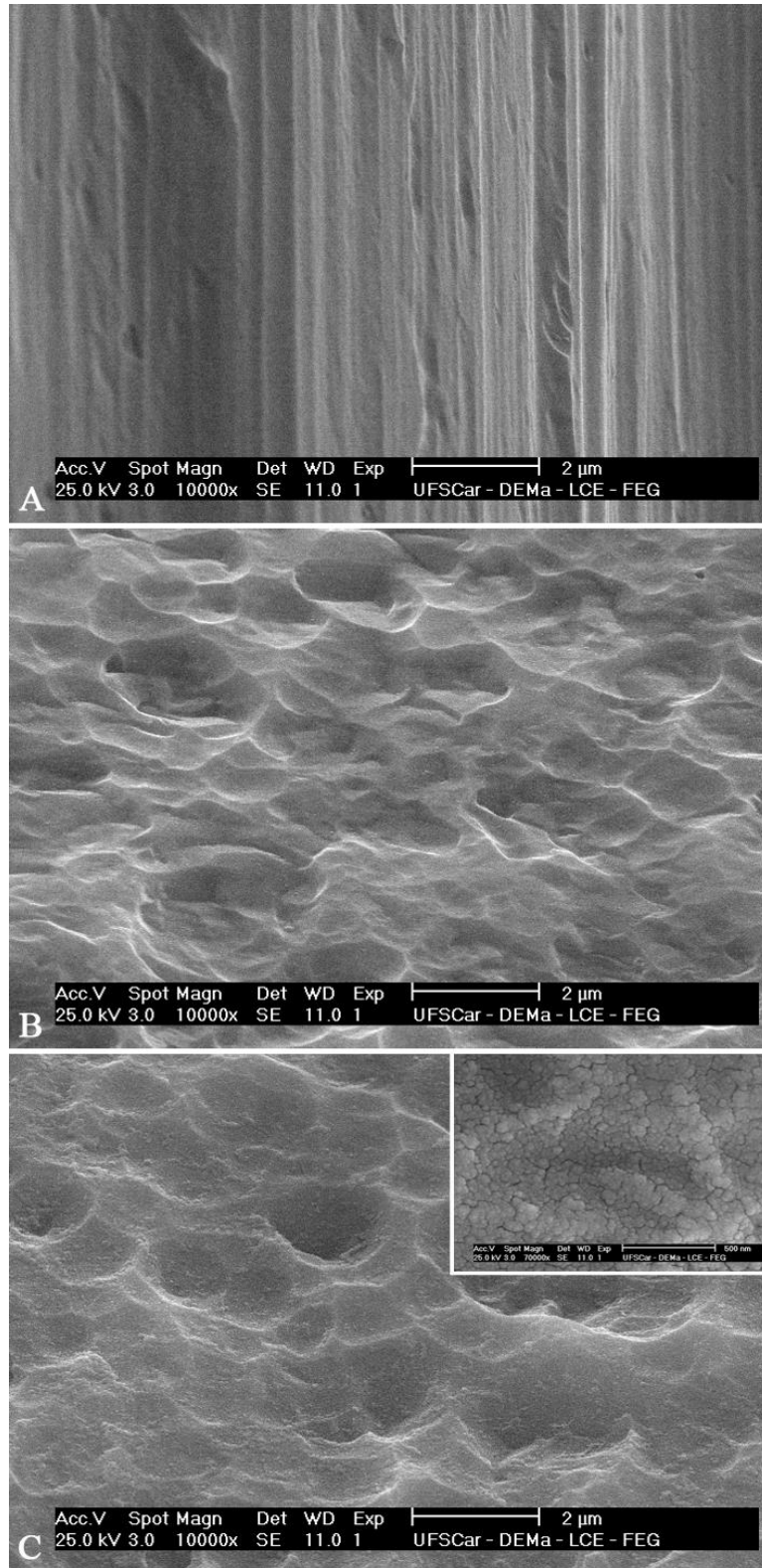


18. Cesar-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20: 713-719.
19. Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010; 25: 63-74.
20. Jimbo R, Coelho PG, Vandeweghe S, et al. Histological and three-dimensional evaluation of osseointegration into nanostructured calcium phosphate-coated implants. *Acta Biomater* 2011.
21. de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004; 25: 403-413.
22. Papalexiou V, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Souza SS, Taba M, Jr., Kajiwarra JK. 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* 2004; 15: 44-53.
23. Schwartz Fo HO, Novaes AB, Jr., de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18: 333-344.
24. Jimbo R, Sotres J, Johansson C, Breiding K, Currie F, Wennerberg A. The biological response to three different nanostructures applied on smooth implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2011.
25. Correa MG, Gomes Campos ML, Cesar-Neto JB, Casati MZ, Nociti FH, Sallum EA. Histometric evaluation of bone around titanium implants with different surface treatments in rats exposed to cigarette smoke inhalation. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: 588-593.
26. Nanci A, Wuest JD, Peru L, et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 1998; 40: 324-335.
27. Nociti FH, Jr., Cesar NJ, Carvalho MD, Sallum EA. Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation: a histometric study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 347-352.
28. Correa MG, Campos ML, Benatti BB, et al. The impact of cigarette smoke inhalation on the outcome of enamel matrix derivative treatment in rats: histometric analysis. *J Periodontol* 2010; 81: 1820-1828.
29. Variola F, Brunski JB, Orsini G, Tambasco de Oliveira P, Wazen R, Nanci A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale* 2010.
30. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986; 1: 11-25.

31. Zarb GA, Schmitt A. The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants: the Toronto Study. Part II: The prosthetic results. *J Prosthet Dent* 1990; 64: 53-61.
32. Lemmerman KJ, Lemmerman NE. Osseointegrated dental implants in private practice: a long-term case series study. *J Periodontol* 2005; 76: 310-319.
33. De Bruyn H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res* 1994; 5: 260-264.
34. Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 292-304.
35. Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15: 331-344.
36. Cesar-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H, Jr., Nociti FH, Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol* 2003; 74: 1454-1459.
37. Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem* 1994; 56: 340-347.
38. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999; 20: 2311-2321.
39. Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16: 389-395.
40. Ueng SW, Lee MY, Li AF, Lin SS, Tai CL, Shih CH. Effect of intermittent cigarette smoke inhalation on tibial lengthening: experimental study on rabbits. *J Trauma* 1997; 42: 231-238.
41. Vervaeke S, Collaert B, Vandeweghe S, Cosyn J, Deschepper E, De Bruyn H. The effect of smoking on survival and bone loss of implants with a fluoride-modified surface: a 2-year retrospective analysis of 1106 implants placed in daily practice. *Clin Oral Implants Res* 2011.
42. Nociti Junior FH, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol* 2002; 73: 982-987.
43. Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 25: 63-74.

**Figure 1**

SEM micrographs of turned (A), micro (B) and nano-roughened (C) implant surface (magnification  $\times 10,000$ , detail in C magnification  $\times 70,000$ ).



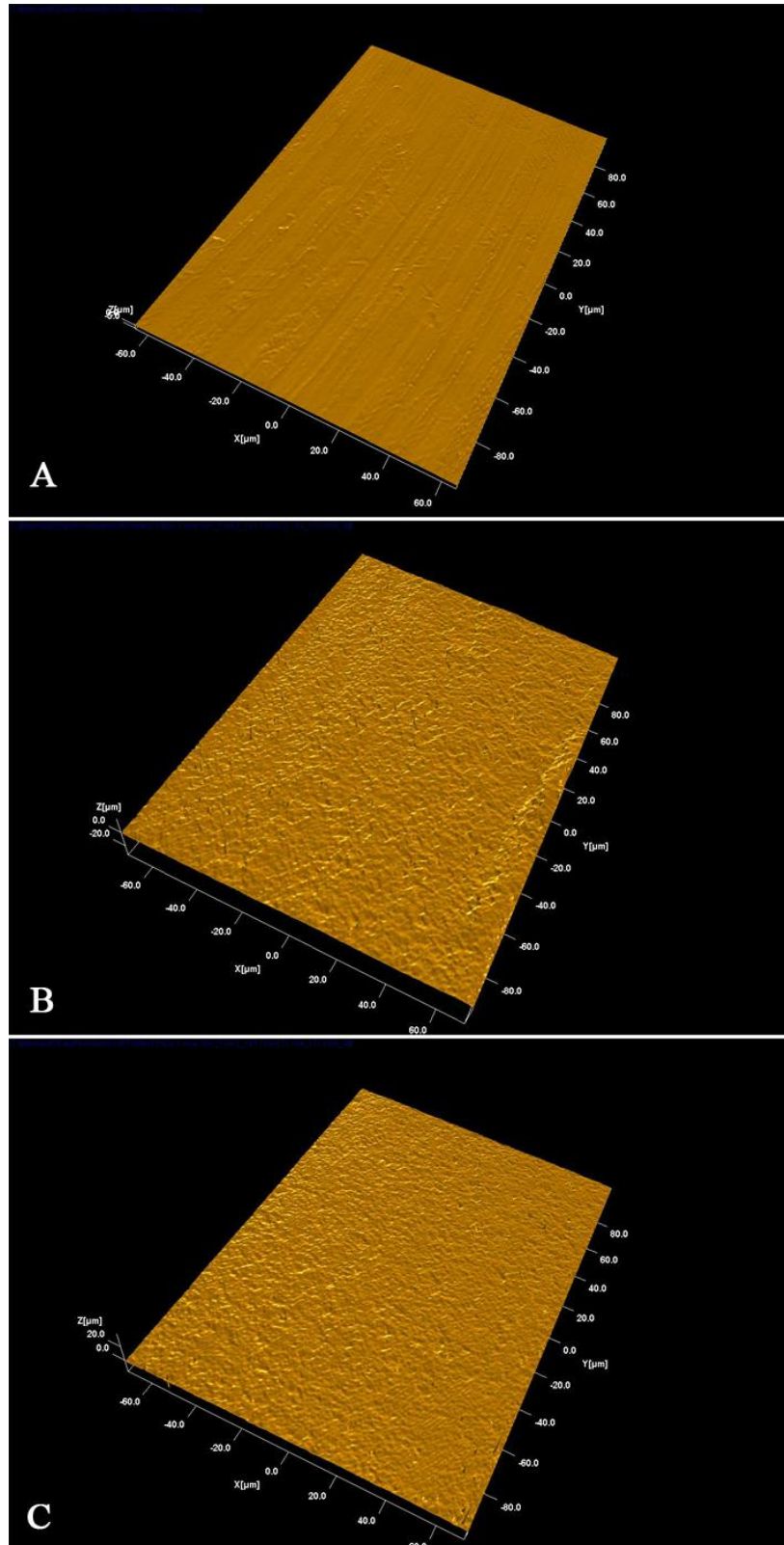
**Table 1**

Numerical description of the surface topography obtained by light interferometry on the micrometer level (n=3).

	$S_a$ $\mu\text{m}$	$S_{ds}$ / $\text{mm}^2$	$S_{dr}$ %
Turned	0.16 $\pm$ 00.2 (3)	148,322 $\pm$ 29,769 (3)	3.40 $\pm$ 1.47 (3)
Micro	0.28 $\pm$ 00.5 (3)	195,900 $\pm$ 9,838 (3)	10.87 $\pm$ 1.06 (3)
Nano	0.28 $\pm$ 00.7 (3)	195,203 $\pm$ 7,871 (3)	8.15 $\pm$ 0.53 (3)

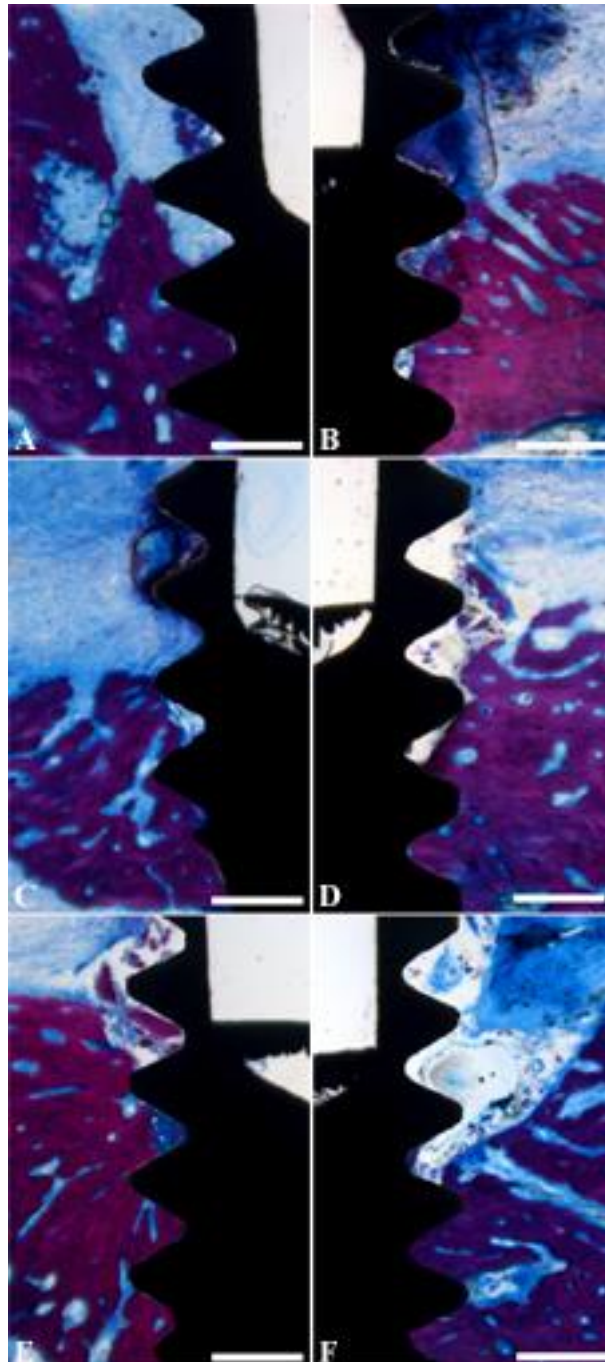
**Figure 2**

Interferometer 3D image of turned (A), micro (B) and nano-roughened (C) implant surface (Measurement area: 260mm X 200 mm).



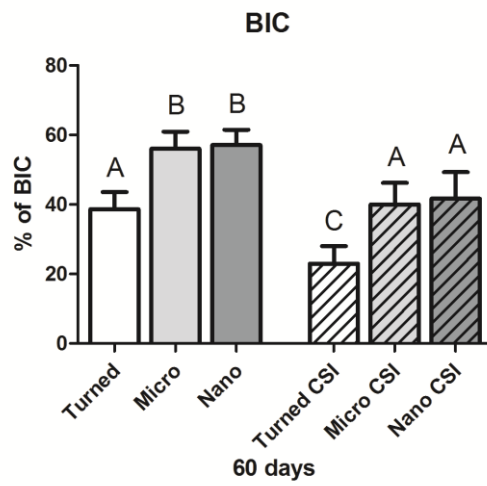
### Figure 3

Histological observation illustrating formed bone in close contact with the implant surface (toluidine blue, bar represent 50 $\mu$ m). No difference was found in histologic morphology between groups. Turned (A), turned CSI (B), micro (C), micro CSI (D), nano (E) and nano CSI (F)



#### Figure 4

Bone implant contact (BIC, % n= 8) for control and cigarette smoke inhalation (CSI) groups after 60 days. Letters indicates statistic differences (Kruskal–Wallis test,  $P < 0.05$ )



**Cytokine production by cultured human gingival fibroblasts on titanium surfaces with nanotopography.**

Humberto Osvaldo Schwartz-Filho<sup>1,2</sup>, Ana Carolina Faria Morandini<sup>3</sup>, Erivan Schnaider Ramos-Junior<sup>4</sup>, Ryo Jimbo<sup>2,5</sup>, Carlos Ferreira Santos<sup>3</sup>, Elcio Marcantonio Junior<sup>1</sup>, Ann Wennerberg<sup>2,5</sup> & Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio<sup>1</sup>

1 Division of Periodontology, Department of Oral Diagnosis and Surgery, School of Dentistry, UNESP, São Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil

2 Surface Biology Group, Department of Prosthodontics, Faculty of Odontology, Malmö University, Sweden

3 Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

4 Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

5 Department of Biomaterials, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Sweden

**Running title: Cytokine production on titanium with nanotopography**

Correspondence to: Humberto Osvaldo Schwartz Filho, Division of Periodontology, Department of Oral Diagnosis and Surgery, School of Dentistry, UNESP, São Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil

Fax: + 55 16 3301-6369

Phone: + 55 16 3301-6376

E-mail: betoschwartz@hotmail.com



## **ABSTRACT**

Implant topography is an important factor that influences many cell types. This study was designed to understand the role of titanium topography in the inflammatory events evaluating the response of human gingival fibroblasts (HGFs) by the release pattern of pro and anti-inflammatory cytokines. HGFs were cultured on Ti discs for 24h and 48h. Four different surfaces were used: turned, micro, nano and an association of micro + nanotopography. Extracellular levels of IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ , IL-4 and IL-10 were detected by ELISA. Increased levels of IL-6 and IL-8 were observed in all surfaces after 24h which were decreased with 48h. Micro, nano and micro + nanotopography showed a reduction in IL-6 levels compared to the machined surface after 48h ( $p < 0.05$ ). In one hand, IL-8 production was lower in micro + nanotopography in comparison to the turned surface ( $p < 0.05$ ). On the other hand, IL-4 showed increased levels with 48h, which were significantly different between turned, micro and nanotopography surfaces, but not with micro + nanotopography. Additionally, TGF- $\beta$  and IL-10 production were not detected. This study indicates that nanotopography might be important in the modulation of the inflammatory response in cultured human gingival fibroblasts.

**Keywords:** cytokines, inflammation, fibroblast, nanotopography, titanium

## INTRODUCTION

Implants surface modification have been made to improve the integration of hard and soft tissues<sup>1</sup>. It has been demonstrated that alterations in topography, energy, wettability, chemistry or an association of them affect cell adhesion, migration, proliferation, differentiation, mRNA expression, protein synthesis and secretion, which may have a beneficial effect on interfacial tissue formation<sup>2-6</sup>. Implant topography has been identified as a key factor that influences attachment and differentiation of many cell types including gingival fibroblasts, which are responsible for the production of the collagen-rich connective tissue surrounding dental implants<sup>7,8</sup>. Thickness and adherence of the connective tissue to implants has been determined to affect events like: inflammatory response, tissue remodeling, biologic width and bone resorption around implants<sup>9-11</sup>.

The response of fibroblasts to different surface topographies has been characterized<sup>7,8,10</sup>. *In vitro*, on rough surfaces such as sand-blasted, large grit, acid-etched (SLA), human gingival fibroblasts (HGFs) exhibit an altered morphology and cell thickness, when compared with those cultured on polished surfaces<sup>12</sup>. Gingival fibroblast behavior has also been shown to be affected by the microtopography of the titanium surfaces<sup>13-15</sup>. On microtopography, HGFs show a high degree of morphologic orientation, alignment of focal adhesions, cytoskeleton and increased migratory ability on microgrooves<sup>16-18</sup>. Implant surface has been identified as an important modulator of fibroblast behavior *in vitro*<sup>19</sup>. *In vivo* results suggest that implant surface characteristics may affect early events of soft tissue healing by influencing collagen fiber orientation and expression of key genes for initial healing<sup>20</sup>. However, the exact mechanisms through which HGFs are influenced by topographies at the molecular level are still poorly understood.

Studies have demonstrated that cytokine networks play an important role in the initiation and progression of the inflammatory response<sup>21,22</sup>. Amongst many inflammatory and immune mediators identified, cytokines have attracted particular attention. Cytokines are proteins secreted by the cells of innate and adaptive immunity that mediate many of the functions of these cells<sup>21</sup>. These soluble mediators of immune reactions are produced as a result of the physiological interaction between cells and environment like dental plaque, or oral microorganisms<sup>23</sup>. They also play important roles in tissue homeostasis, and in periodontology and implantology they are involved in inflammation-related alteration and repair of periodontal or peri-implant tissues<sup>24</sup>. Extracellular matrix including collagens and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) superfamily are known to be associated with healing<sup>25</sup> also. During the progression of inflammation, periodontal ligament and gingival fibroblasts secrete high levels of cytokines and chemokines<sup>26</sup>.

Inflammatory response to biomaterials has been identified as an important factor in the healing process around implants<sup>27</sup>, controlling the shift from inflammation to repair and regeneration by providing the appropriate signals<sup>28</sup>. Furthermore, it has been shown that surface topography contributes to the downregulation of inflammatory events<sup>9,29</sup>. Since we know that topography is able to improve fibroblasts response *in vitro*, and that it can induce clinical benefits in early healing, increase adherence of soft tissue, as well as to reduce marginal bone resorption<sup>10</sup>, the aim of this study was to understand the role of titanium topography in the inflammatory events evaluating the response of human gingival fibroblasts by the release pattern of cytokines.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Samples and Surface Characterization***

Discs were provided by Neodent (Curitiba, Paraná, Brazil). Commercially pure titanium (Grade 4) discs (10mm in diameter and 2mm thick) were used with 4 different surfaces: turned, micro, nanotopography and micro+nanotopography. Micro surface was obtained with a blasting procedure with aluminum oxide particles, followed by an acid-etching procedure (proprietary processing). Nanotopography was obtained by treating it with a solution consisting of equal volumes of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 30% aqueous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, like previously described<sup>25</sup>. Micro+nanotopography was obtained with an association of both methods.

An interferometer was used to characterise samples topography in a micrometer level (MicroXam; ADE Phase Shift Technology Inc., Tucson, USA), and an atomic force microscopy (AFM) (Dimension 3000 SPMTM, Digital Instruments, Santa Barbara, USA) was utilized for the evaluation of nanostructures. The parametric calculation was performed after form errors and waviness were removed with a 50  $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$  Gaussian filter. The following three-dimensional parameters were selected: S<sub>a</sub> ( $\mu\text{m}$ ), the arithmetic average height deviation from a mean plane; S<sub>ds</sub> ( $\mu\text{m}^{-2}$ ), the density of summits; and S<sub>dr</sub> (%), the developed surface ratio. Scanning electron microscopy (SEM) (LEO 440 – Zeiss, Oberkochen, Germany) was used for the assessment of surface morphology and analysis of x-ray spectroscopy (EDS)(LEO 440) was used to evaluate the surface chemical composition. Three samples from each group were randomly selected.

### ***Cell culture***

HGFs were primarily cultured as previously described<sup>22,30</sup>. Briefly, fibroblasts were obtained from gingival explants of clinically non-inflamed tissue retrieved from the gingival margin of volunteer donors after written informed consent in accordance

with the Institutional Review Board of Bauru School of Dentistry, University of São Paulo. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and antibiotics (600 µl/ml penicillin, 300 µl/ml gentamicin sulfate, and 100 µl/ml amphotericin B) incubated at 37<sup>0</sup>C in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide until confluence and were used between 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> passages for experiments. For the titanium surface experiments, fibroblasts were seeded on the different titanium surfaces in a density of 1,2 x 10<sup>4</sup> cells/well in 24-well plates. After 24 and 48 hours, the supernatant of the cells were collected and analyzed by Enzyme-Linked Immunoenzymatic Assay (ELISA).

### ***Elisa***

Extracellular levels of IL-6, IL-8, TGF-β, IL-4 and IL-10 were detected by ELISA according to the manufacturer's instructions (eBioscience, San Diego, CA, USA). Briefly, 96-well plates were coated with anti-human monoclonal antibodies for each target. After blocking for 1 hour to avoid non-specific binding, 100 µl of standard IL-6, IL-8, TGF-β, IL-4 and IL-10 and culture supernatants were placed. The cytokines were detected by horseradish peroxidase-labeled monoclonal antibody to each target after binding of the anti-human biotinylated antibodies in each well. The microplate was washed to remove unbound enzyme-labeled antibodies. The amount of horseradish peroxidase bound to each well was determined by the addition of the substrate solution. The reaction was stopped by the addition of 100 µl of 1 M sulfuric acid, and the plates were read at 450 nm in a ELISA Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The cytokines concentrations were determined by interpolation from a standard curve and presented as picograms per milliliter (+-standard deviation) for duplicate assays of duplicate samples of each of the tested conditions.

### ***Statistical analysis***

Statistical analyses were performed with the software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) by the one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by the Tukey post-test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## **RESULTS**

### ***Implant Characterization***

The 3D AFM images of surface roughness are shown in Figure 1. The numerical description of the surface topography, obtained by light interferometry, on the micrometer level is presented in Table 1. The 3D optical interferometry images of surface roughness are shown in Figure 2. The results shown that turned surface present low values compared with others for all evaluated parameters.  $S_{dr}$  was significant higher for the blasted plus acid-etched procedure surface. The SEM images for the surface revealed different surface topographies (data not shown). Turned surface showed randomly distributed grooves generated by the machining procedure. The micro surface was featured by large pits at the micron-scale, whereas the nano surface exhibited a distinctive nano-scale pitted topography. Micro + nano surface revealed the conjunction of both aspects. EDS X-ray microanalysis demonstrated that chemical composition remains the same for all surfaces after the manufacturing processes used to create micro and nanotopographic features.

### ***Cytokines levels***

It was observed an increase in IL-6 and IL-8 production by the fibroblasts in all the different surface topographies with 24 hours which were reduced after 48 hours

(Figures 3 and 4). Micro, nano and micro + nanotopography showed reduced IL-6 levels compared to the turned surface with 48 hours ( $p < 0.05$ ). On the other hand, IL-8 production was lower in the micro + nanotopography surface compared to turned discs ( $p < 0.05$ ). IL-4 was significantly upregulated with 48 hours in turned, micro and nanotopography, and showed a trend to be upregulated in micro + nanotopography, but not statistically significant (Figure 5). However, for micro+nanotopography, IL-4 was higher than the turned surface with both 24 and 48h (Figure 5). Additionally, TGF- $\beta$  and IL-10 production were not detected.

## **DISCUSSION**

Evidence that topographic changes may stimulate and guide various molecular and biological processes in osseointegration has stimulated the development of implant surfaces in micro and nano scale. The aim of this study was to evaluate the influence of the surface topography on inflammatory cytokines expression in an *in vitro* model of cultured HGFs on titanium disks.

Regarding the surfaces, the characterization through analysis of micro and nano scale parameters, as well as their chemistry, is of fundamental importance. Only with the correct characterization, it is possible to discuss the potential benefits, understanding the mechanism responsible for the results. EDS results showed that the process for obtaining the topography did not cause any difference in chemistry between the surfaces studied. The topography observation showed minimum roughness of the surfaces differentiated by the presence of microstructures and nanostructures observed with AFM.

A strong demand in oral implants design is looking for the production of a surface that promotes strong attachment of the implant, not only to the bone but also to

surrounding soft tissues. It has been previously demonstrated that surface processing influences the HGFs adhesion and the expression of adhesion-related molecules on their cytoplasmatic membrane<sup>31</sup>. Fibroblasts may also optimize the alignment of actin fibers on very smooth surfaces, where they are mainly spindle-shaped and elongated with no clear orientation. According to a previous report<sup>32</sup>, changes in surface pattern, in the micrometer range, lead to different tissue reactions when the microstructure is implanted subcutaneously.

The relationship between surfaces and the inflammatory response is known to be important to the repair process in implants adjacent tissues<sup>27</sup>. Surfaces topographies are directly related to the behavior of different cell types. Among the different cell types involved in the formation of peri-implant tissue, fibroblasts play a key role in the synthesis of collagen in connective tissue around dental implants<sup>7,8</sup>. Fibroblasts are also directly related with the inflammatory response, with tissue remodeling, and bone formation and resorption around implants<sup>9,11</sup>.

The focus of studies has been to understand the relationship of fibroblasts and inflammatory response to different titanium surfaces in order to understand their real role in the events already mentioned. Recent studies show that the topography can have an important role in the regulation of inflammatory events<sup>9,29</sup>. It has been shown that the topography can influence the response of fibroblasts *in vitro*, and that it can also induce clinical benefits with regard to both soft and hard tissues<sup>10</sup>. Infections lead to inflammatory reactions in the oral tissue surrounding dental implant surfaces and subsequently induce bone loss around the implant<sup>33,34</sup>. In previous observations of the oral tissue response to the implant surface, surface modification of titanium abutment materials significantly influenced the attachment and growth of fibroblasts<sup>35,36</sup>.



The main finding of this study is that topography influences the pattern of cytokine expression in HGFs. An increased IL-6 and IL-8 production by fibroblasts was found in all surfaces studied with 24h. It is important to emphasize that a significant reduction of IL-6 was observed in the treated surfaces compared to the turned surface. On the other hand, the production of IL-8 was lower only in the micro + nanotopography surface compared with turned surface. Regarding IL-4, there was an increase in 48 hours compared to 24h in turned, micro and nanotopography, and only for the micro + nanotopography surface this increase was not statistically significant to 24h. However the IL-4 total levels were higher at 24 and 48 h when compared with other surfaces.

The results of this study suggest that the association of micro + nanotopography can bring benefits in comparison with the other surfaces studied, since the pro-inflammatory cytokine IL-8, was expressed in a reduced manner compared to the others and IL-4, an anti-inflammatory mediator, was significantly upregulated in the referred surface. The mechanisms by which surfaces modulate the expression of different cell markers are not completely understood. Molecular studies of the effects of different materials on cell behavior characteristics are becoming more frequent and should help to clarify the events related to cell signaling.

## **CONCLUSION**

Our findings suggest that Ti surfaces may play an important role in modulating the cytokine release in cultured human gingival fibroblasts.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Neodent Company for supplying the samples used in this study. There were no conflicts of interest.

## REFERENCES

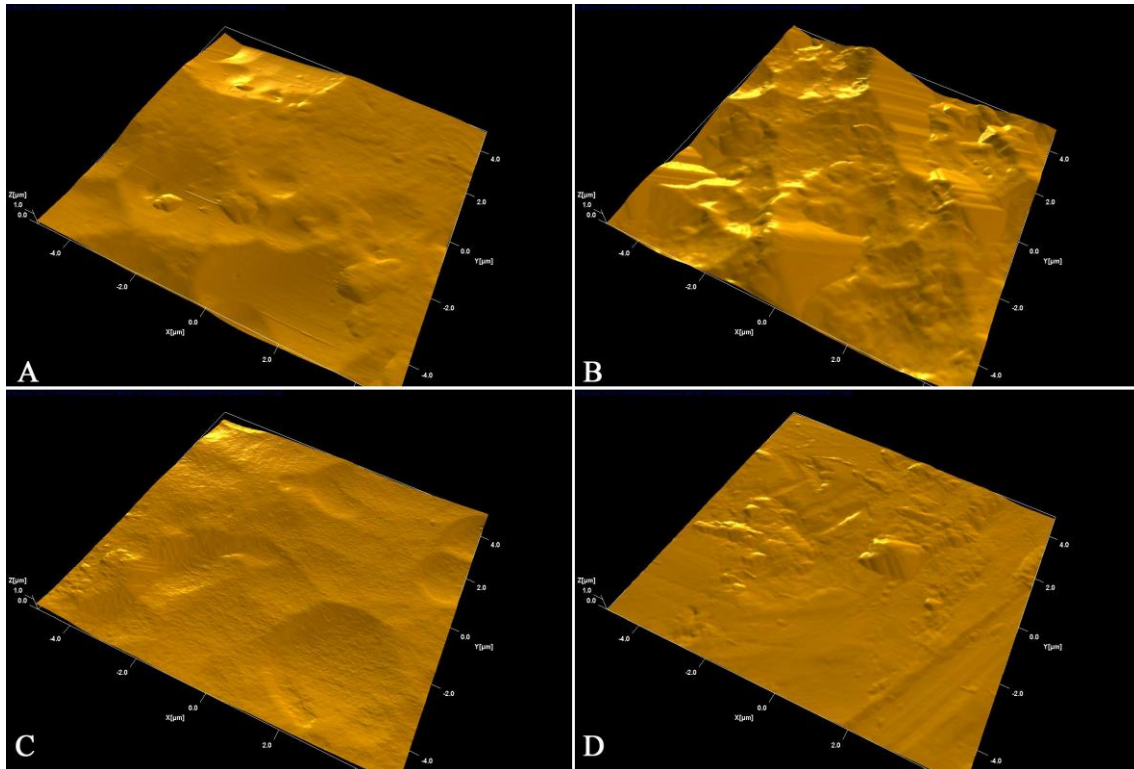
1. Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25(1):63-74.
2. Jimbo R, Coelho PG, Vandeweghe S, Schwartz-Filho HO, Hayashi M, Ono D, Andersson M, Wennerberg A. Histological and three-dimensional evaluation of osseointegration into nanostructured calcium phosphate-coated implants. *Acta Biomater* 2011.
3. de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004;25(3):403-13.
4. Papalexiou V, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Souza SS, Taba M, Jr., Kajiwarra JK. 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* 2004;15(1):44-53.
5. Schwartz Fo HO, Novaes AB, Jr., de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(3):333-44.
6. Jimbo R, Sotres J, Johansson C, Breeding K, Currie F, Wennerberg A. The biological response to three different nanostructures applied on smooth implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2011.
7. Kim H, Murakami H, Chehroudi B, Textor M, Brunette DM. Effects of surface topography on the connective tissue attachment to subcutaneous implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21(3):354-65.
8. Kokubu E, Hamilton DW, Inoue T, Brunette DM. Modulation of human gingival fibroblast adhesion, morphology, tyrosine phosphorylation, and ERK 1/2 localization on polished, grooved and SLA substratum topographies. *J Biomed Mater Res A* 2009;91(3):663-70.
9. Palmquist A, Johansson A, Suska F, Branemark R, Thomsen P. Acute Inflammatory Response to Laser-Induced Micro- and Nano-Sized Titanium Surface Features. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011.
10. Wennerberg A, Frojd V, Olsson M, Nannmark U, Emanuelsson L, Johansson P, Josefsson Y, Kangasniemi I, Peltola T, Tirri T and others. Nanoporous TiO<sub>2</sub> Thin Film on Titanium Oral Implants for Enhanced Human Soft Tissue Adhesion: A Light and Electron Microscopy Study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011;13(3):184-196.

11. Frojd V, Wennerberg A, Franke Stenport V. Importance of Ca(2+) Modifications for Osseointegration of Smooth and Moderately Rough Anodized Titanium Implants - A Removal Torque and Histological Evaluation in Rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res* 2010.
12. Wieland M, Chehroudi B, Textor M, Brunette DM. Use of Ti-coated replicas to investigate the effects on fibroblast shape of surfaces with varying roughness and constant chemical composition. *J Biomed Mater Res* 2002;60(3):434-44.
13. Eisenbarth E, Meyle J, Nachtigall W, Breme J. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials* 1996;17(14):1399-403.
14. Mustafa K, Oden A, Wennerberg A, Hultenby K, Arvidson K. The influence of surface topography of ceramic abutments on the attachment and proliferation of human oral fibroblasts. *Biomaterials* 2005;26(4):373-81.
15. Tete S, Mastrangelo F, Bianchi A, Zizzari V, Scarano A. Collagen fiber orientation around machined titanium and zirconia dental implant necks: an animal study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24(1):52-8.
16. Brunette DM. Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions. *Exp Cell Res* 1986;164(1):11-26.
17. Clark P, Connolly P, Curtis AS, Dow JA, Wilkinson CD. Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata. *Development* 1990;108(4):635-44.
18. Hamilton DW, Brunette DM. "Gap guidance" of fibroblasts and epithelial cells by discontinuous edged surfaces. *Exp Cell Res* 2005;309(2):429-37.
19. Hamilton DW, Chehroudi B, Brunette DM. Comparative response of epithelial cells and osteoblasts to microfabricated tapered pit topographies in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2007;28(14):2281-93.
20. Yamano S, Al-Sowaygh ZH, Gallucci GO, Wada K, Weber HP, Sukotjo C. Early peri-implant tissue reactions on different titanium surface topographies. *Clin Oral Implants Res* 2011;22(8):815-819.
21. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2005;32 Suppl 6:108-29.
22. Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF-beta, interleukin (IL)-8 and IL-10. *Braz Oral Res* 2011;25(2):157-62.
23. Petkovic AB, Matic SM, Stamatovic NV, Vojvodic DV, Todorovic TM, Lazic ZR, Kozomara RJ. Proinflammatory cytokines (IL-1beta and TNF-alpha) and chemokines (IL-8 and MIP-1alpha) as markers of peri-implant tissue condition. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39(5):478-85.

24. Ericsson I, Persson LG, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J, Klinge B. Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues. *J Clin Periodontol* 1995;22(3):255-61.
25. Wikesjo UM, Selvig KA. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol* 2000 1999;19:21-39.
26. Boch JA, Wara-aswapati N, Auron PE. Interleukin 1 signal transduction--current concepts and relevance to periodontitis. *J Dent Res* 2001;80(2):400-7.
27. Peltroche-Llacsahuanga H, Schmidt S, Schnitzler N, Lutticken R, Haase G. Simultaneous measurement of biopolymer-mediated Mac-1 up-regulation and adherence of neutrophils: a novel flow cytometric approach for predicting initial inflammatory interaction with foreign materials. *J Immunol Methods* 2001;258(1-2):13-25.
28. Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface* 2010;7 Suppl 5:S515-27.
29. Kloss FR, Steinmuller-Nethl D, Stigler RG, Ennemoser T, Rasse M, Hachl O. In vivo investigation on connective tissue healing to polished surfaces with different surface wettability. *Clin Oral Implants Res* 2011;22(7):699-705.
30. Morandini AC, Sipert CR, Gasparoto TH, Greggi SL, Passanezi E, Rezende ML, Sant'ana AP, Campanelli AP, Garlet GP, Santos CF. Differential production of macrophage inflammatory protein-1alpha, stromal-derived factor-1, and IL-6 by human cultured periodontal ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolysaccharide from *P. gingivalis*. *J Periodontol* 2010;81(2):310-7.
31. Hormia M, Kononen M. Immunolocalization of fibronectin and vitronectin receptors in human gingival fibroblasts spreading on titanium surfaces. *J Periodontol Res* 1994;29(2):146-52.
32. Campbell CE, von Recum AF. Microtopography and soft tissue response. *J Invest Surg* 1989;2(1):51-74.
33. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008;35(8 Suppl):282-5.
34. Fransson C, Wennstrom J, Tomasi C, Berglundh T. Extent of peri-implantitis-associated bone loss. *J Clin Periodontol* 2009;36(4):357-63.
35. Mustafa K, Silva Lopez B, Hultenby K, Wennerberg A, Arvidson K. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO<sub>2</sub> particles. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res* 1998;9(3):195-207.
36. Groessner-Schreiber B, Neubert A, Muller WD, Hopp M, Griepentrog M, Lange KP. Fibroblast growth on surface-modified dental implants: an in vitro study. *J Biomed Mater Res A* 2003;64(4):591-9.

## Figure 1

Atomic Force Microscopy 3D image of turned (A), micro (B), nano-roughened (C) and micro + nano-roughened (D) implant surface. (Measurement area: 260nm X 200 nm).



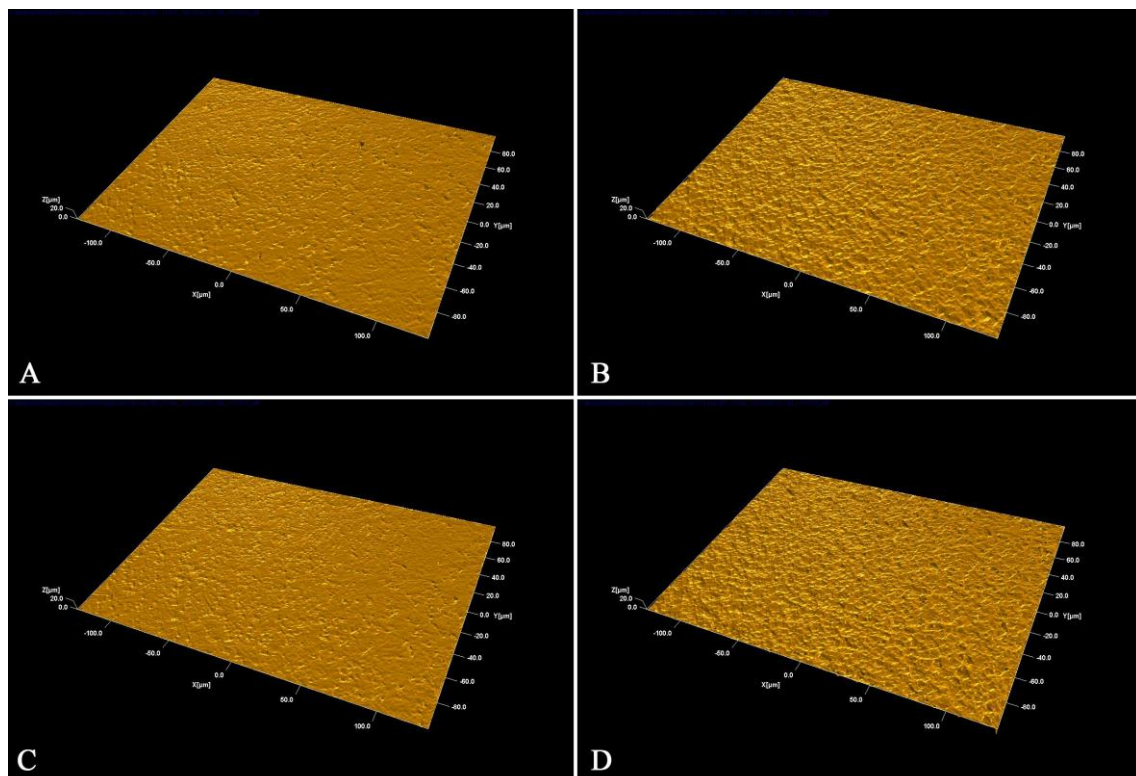
**Table 1**

Numerical description of the surface topography obtained by light interferometry on the micrometer level (n=3).

	$S_a$ $\mu\text{m}$	$S_{ds}$ / $\text{mm}^2$	$S_{dr}$ %
Turned	$0.28 \pm 0.2$	$148,322 \pm 29,769$	$3.40 \pm 1.47$
Micro	$0.57 \pm 0.5$	$195,900 \pm 9,838$	$10.87 \pm 1.06$
Nano	$0.27 \pm 0.7$	$195,203 \pm 7,871$	$8.15 \pm 0.53$
Micro+Nano	$0.61 \pm 0.5$	$164,292 \pm 3,281$	$12.07 \pm 1.15$

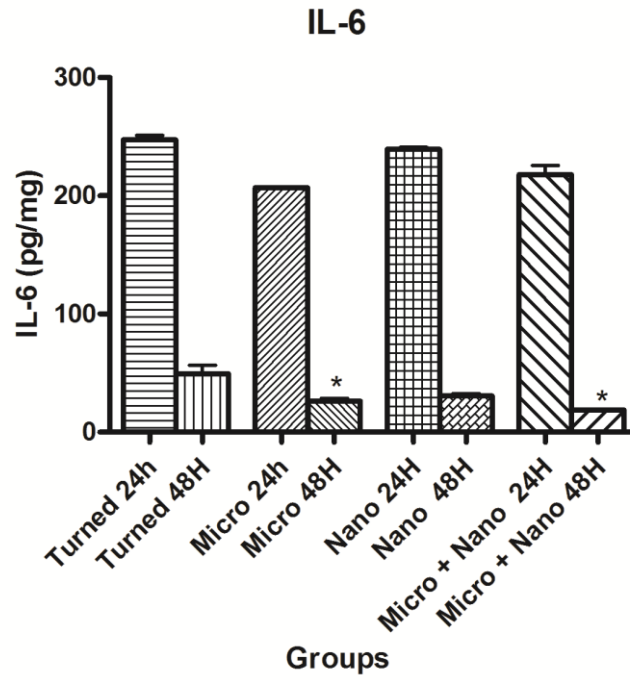
**Figure 2**

Interferometer 3D image of turned (A), micro (B) and nano-roughened (C) and micro + nano-roughened (D) implant surface (Measurement area: 260mm X 200 mm).



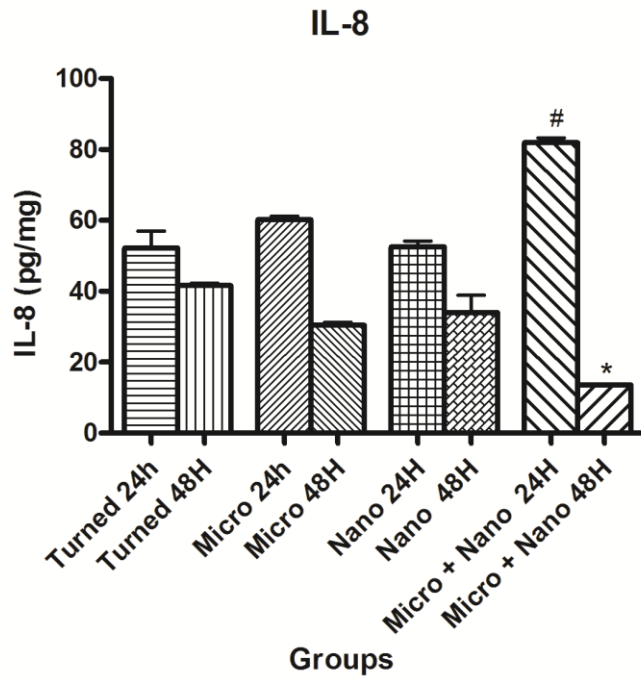
**Figure 3**

All surfaces showed a reduction in the production of IL-6. Control turned surface (\* p <0.05 compared with control 48 h; ANOVA followed by Tukey post-test).



**Figure 4**

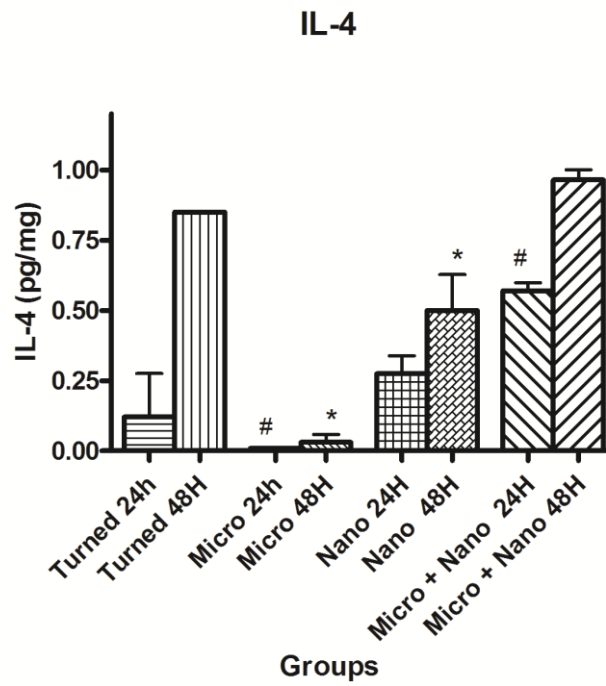
The production of IL-8 was lower for micro + nanotopography in 48h ( $p < 0.05$ ). Control turned surface (\*  $p < 0.05$  compared with control 48h, #  $p < 0.05$  compared to control 24h; ANOVA followed by Tukey post-test)





**Figure 5**

IL-4 showed an increase in 48 h for all surfaces. Control turned surface (\*  $p < 0.05$  compared with control 48h, #  $p < 0.05$  compared to control 24h; ANOVA followed by Tukey post-test).





Journal of Biomedical  
Materials Research  
Part B: Applied Biomaterials

**The early effect of laminin-1 doped nano-roughened implant surfaces: gene expression and morphological evaluations**

Journal:	<i>Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials</i>
Manuscript ID:	JBMR-B-11-0461
Wiley - Manuscript type:	Original Research Report
Date Submitted by the Author:	12-Aug-2011
Complete List of Authors:	Schwartz-Filho, Humberto Bougas, Kostas Xue, Ying Hayashi, Mariko Faeda, Rafael Marcantonio, Rosemary Mustafa, Kamal; University of Bergen, Clinical Dentistry Jimbo, Ryo; Malmö University, Department of Prosthodontics; Gothenburg University, Department of Biomaterials Wennerberg, Ann; Malmö University, Faculty of Odontology
Keywords:	Nanomaterials/nanophase, protein adsorption, implant interface

SCHOLARONE™  
Manuscripts

ew

1  
2  
3 **The early effect of laminin-1 doped nano-roughened implant surfaces: gene**  
4 **expression and morphological evaluations.**  
5  
6

7 Humberto Osvaldo Schwartz-Filho<sup>a,b</sup>, Kostas Bougas<sup>a</sup>, Ying Xue<sup>c</sup>, Mariko Hayashi<sup>a</sup>,  
8  
9 Rafael Silveira Faeda<sup>b</sup>, Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio<sup>b</sup>, Kamal Mustafa<sup>c</sup>,  
10  
11 Ryo Jimbo<sup>a,b,\*</sup> & Ann Wennerberg<sup>a,b</sup>  
12  
13  
14  
15  
16  
17

18 <sup>a</sup> *Surface Biology Group, Department of Prosthodontics, Faculty of Odontology, Malmö*  
19 *University, Sweden*  
20  
21

22 <sup>b</sup> *Division of Periodontology, Department of Oral Diagnosis and Surgery, School of*  
23 *Dentistry, UNESP, São Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil*  
24  
25

26 <sup>c</sup> *Department of Clinical Dentistry, Center for Clinical Dental Research, University of*  
27 *Bergen, Norway*  
28  
29

30 <sup>d</sup> *Department of Biomaterials, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Sweden*  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39 **Running title: Effect of protein doping on osseointegration**

40 \*Correspondence to; Dr. Ryo Jimbo, Department of Prosthodontics, Faculty of  
41  
42 Odontology, Malmö University, 205 06 Malmö, Sweden  
43  
44

45 Fax +46 40 665 8503

46  
47 Phone +46 40 665 8679

48  
49 E-mail: ryo.jimbo@mah.se  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**ABSTRACT**

Protein adsorption onto an implant surface has been widely discussed and may be important for osseointegration. The purpose was to observe the morphological and molecular effect of laminin-1 (LN-1) doping to nanostructured implant surfaces. Nanostructured implants (Neodent, Curitiba, Paraná, Brazil) were coated with laminin-1 (test; dilution, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and inserted into the rabbit tibiae. Non-coated implants were used as control. After 2 weeks of healing, the implants were removed and subjected to morphological analysis using scanning electron microscopy (SEM) or gene expression analysis using the real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). SEM revealed bony tissue attachment for both control and test implants. Real-time RT-PCR analysis revealed that the expression of osteoblast markers RUNX-2, osteocalcin, alkaline phosphatase, and collagen I was higher (1.62-fold, 1.53-fold, 1.97-fold, and 1.04-fold, respectively) on the implants modified by laminin-1. All osteoclast markers investigated in the study presented higher expression on the test implants than on the control one; tartrate-resistant acid phosphatase (1.67-fold), calcitonin receptor (1.35-fold), and ATPase (1.25-fold). The test implants demonstrated higher expression of inflammatory markers interleukin-10 (1.53-fold), and tumour necrosis factor-  $\alpha$  (1.61-fold). The protein-doped surface showed higher gene expression of typical genes involved in the osseointegration cascade than the control surface.

**Keywords:** nanostructures; protein coating; laminin; gene expression

## 1. Introduction

The osseointegration cascade begins immediately after the implant is placed in the bone, where the blood contiguously spreads throughout the implant surface. Irrespective of the biomaterial, surface topography, or wettability status of the surface, the initial contact with blood will rapidly attract proteins<sup>1</sup>, which in turn will initiate the process of bone formation<sup>2,3</sup>. In fact, protein adsorption to the implant surface has been suggested to be important for the osteoconduction stage of osseointegration<sup>4,5</sup>, further, studies have investigated the significance of this phenomenon<sup>6-8</sup>, in which some proteins significantly enhance migration, attachment, proliferation, and differentiation at the implant surface<sup>7</sup>. Protein adsorption to biomaterials is intriguing because one specific protein never remains in a single niche and constantly undergoes alterations depending on its molecular weight<sup>9</sup>. The so-called 'Vroman effect' is an indication that proteins play different roles in biological reactions. For example, the effect of plasma fibronectin has been thoroughly studied along with bone biomechanical properties, and it has been reported to be a regulator of bone density<sup>10</sup>. Collagen type I, which is the major constituent protein of the bone matrix, assembles in the presence of fibronectin<sup>11</sup>. Collagen type I along with fibronectin is considered to be one of the indispensable proteins for osteogenesis<sup>12</sup>. Hence, it has been indicated that doping implant surfaces with proteins that have been reported to be related to the bone matrix, may improve both the quality and the rate of osseointegration<sup>7,13-15</sup>.

An important factor when doping the implant surface with proteins is the surface topography. It has been reported that surface topography can influence cell

1  
2  
3 adhesion and downstream differentiation by enhancing the effects of adsorbed protein  
4 layers<sup>16</sup>. In addition, it has been suggested that surfaces with a topographical feature  
5 at the nano level show a high affinity for protein adsorption<sup>17</sup>. Such surface  
6 topography may be suitable for sustaining higher volumes of target proteins, and has  
7 been suggested to facilitate implant adherence for a longer duration<sup>7</sup>, probably  
8 because of the enlarged surface area.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

19 In the present study, we have focused on another potential osteogenesis-  
20 enhancing protein, namely, laminin-1 (LN-1), which is a unique heterotrimeric  
21 glycoprotein that contains an arginine–glycine–aspartic acid (RGD) sequence<sup>18</sup>. RGD  
22 is an integrin receptor binder, which is commonly found within the extracellular  
23 matrix proteins, and is the most widely occurring cell adhesive motif recognised by  
24 about 50% of all known integrins such as  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ , and  $\alpha_v\beta_5$ <sup>19</sup>. It  
25 has been reported that when applied to implant surfaces, the RGD sequence-  
26 impregnated modification significantly enhances osseointegration<sup>20,21</sup>, and supposedly  
27 upregulates the osteoblast focal adhesion through integrin-mediated mechanisms<sup>22</sup>.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

41 Besides the well-known bone forming ability of the RGD sequence, an  
42 interesting feature of LN-1 is that it has been reported to selectively recruit  
43 osteoprogenitor cells, and inhibit the attachment of other cell populations<sup>23</sup>. Hence,  
44 doping the implant with this unique protein may upregulate bone apposition to the  
45 implant surface.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

54 The aim of the present study was to dope an implant possessing nanostructures  
55 with LN-1 and observe the biological response at the implant interface. We  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 hypothesised that the addition of LN-1 would enhance osteogenic responses in the  
4  
5 early stages of osseointegration. To test our hypothesis, we placed such implants in  
6  
7 rabbit tibiae and observed the morphology of the bone attached to the implant surface.  
8  
9  
10 Furthermore, total mRNA was extracted from the various samples to evaluate the  
11  
12 expression of genes involved in the process of inflammation and bone remodelling  
13  
14 using RT-PCR.  
15  
16  
17

## 18 **2. Materials and Methods**

### 19 20 21 22 *2.1 Surface Characterization*

23  
24  
25  
26  
27 Scanning electron microscopy (SEM) (LEO 440 – Zeiss, Oberkochen,  
28  
29 Germany) was used for the assessment of surface morphology. The topography of the  
30  
31 implants was characterised using an interferometer (MicroXam; ADE Phase Shift  
32  
33 Technology Inc., Tucson, AZ). The parametric calculation was performed after form  
34  
35 errors and waviness were removed with a  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  Gaussian filter. The  
36  
37 following three-dimensional parameters were selected:  $S_a$  ( $\mu\text{m}$ ), the arithmetic  
38  
39 average height deviation from a mean plane;  $S_{ds}$  ( $\mu\text{m}^{-2}$ ), the density of summits; and  
40  
41  $S_{dr}$  (%), the developed surface ratio. Three implants were randomly selected for the  
42  
43 analysis.  
44  
45  
46  
47  
48

### 49 50 *2.2 Implants and Lamnin Coating*

51  
52  
53  
54 We used commercially pure titanium (Grade 4) implants (length, 2mm;  
55  
56 diameter, 1.5 mm). All implants were provided by Neodent (Curitiba, Paraná, Brazil).  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 The surface was nanotextured by treating it with a solution consisting of equal  
4  
5 volumes of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 30% aqueous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 4 h at room temperature  
6  
7 under sterile conditions<sup>24</sup>.  
8

9  
10 Laminin-1 (L2020, Sigma-Aldrich, Stockholm, Sweden) was diluted to a  
11  
12 concentration of 100 µg/mL in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) without  
13  
14 CaCl<sub>2</sub> or MgCl<sub>2</sub> (14190-094; GIBCO, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY,  
15  
16 USA). The implants were subsequently incubated in 48-well plates (Nunclon Surface,  
17  
18 Nunc, Roskilde, Denmark) containing 250 µL of the laminin solution per well for 1 h  
19  
20 at room temperature.  
21  
22

### 23 24 25 *2.3 Animals and Implant Surgery* 26

27  
28  
29  
30 Nine lop-eared male rabbits (mean body weight, 4.0 kg) of were used for the  
31  
32 study. One test (LN-1 coated) implant and one control (non-coated) implant was  
33  
34 inserted into the left and right tibial metaphysis respectively. The animal study was  
35  
36 approved by the Malmö/Lund, Sweden regional animal ethics committee (approval  
37  
38 number: M282-09).  
39

40  
41 Before surgery, the hind legs were shaved and disinfected with 70% ethanol and  
42  
43 70% chlorhexidine. The animals were anaesthetised with intramuscular injections of a  
44  
45 mixture of 0.15 mL/kg medetomidine (1 mg/mL Dormitor; Orion Pharma, Sollentuna,  
46  
47 Sweden) and 0.35 mL/kg ketamine hydrochloride (50 mg/mL Ketalar; Pfizer AB,  
48  
49 Sollentuna, Sweden). Lidocaine hydrochloride (Xylocaine; AstraZeneca AB,  
50  
51 Södertälje, Sweden) was administrated as the local anaesthetic at each insertion site at  
52  
53 a dose of 1 mL. After the operation, buprenorphine hydrochloride (0.5 mL Temgesic;  
54  
55 Reckitt Benckiser, Slough, UK) was administered as an analgesic for 3 days.  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 After 2 weeks, the rabbits were sacrificed with an overdose (60 mg/mL) of  
4 pentobarbitalnatrium (Apoteksbolaget AB, Stockholm, Sweden).  
5  
6  
7  
8

#### 9 10 *2.4 Observation of the Implant Interface by SEM*

11  
12  
13  
14 Implants from both groups (n = 3) were removed from the tibiae, cleaned in  
15 4% neutral-buffered formaldehyde solution for 10 min, dehydrated using an  
16 ascending series of ethanol, and dried. The retrieved implant samples were observed  
17 using SEM.  
18  
19  
20  
21  
22  
23

#### 24 25 *2.5 Extraction of RNA and Real-time RT-PCR*

26  
27  
28  
29 For gene expression analysis, both control and test groups were removed and  
30 the retrieved samples were placed in RNAlater solution (QIAGEN GmbH, Hilden,  
31 Germany) until analysis. In order to achieve the detectable RNA, each of the 9  
32 samples in the control and test groups were pooled for RNA isolation. Total RNA was  
33 isolated from the surrounding tissue using Trizol<sup>®</sup> reagent (Gibco BRL, Carlsbad,  
34 CA) and EZNA<sup>™</sup> tissue RNA isolation kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA). Total  
35 RNA was quantified using a nanodrop spectrophotometer (ThermoScientific  
36 NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47 The reverse transcription reaction test was performed according to the  
48 manufacturer's instructions, using the high capacity cDNA archive kit (Applied  
49 Biosystems, Foster City, USA). Total RNA (6 ng/ $\mu$ L) was mixed with reverse  
50 transcriptase (RT) buffer, random primers, and Multiscribe RT.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Real-time quantitative RT-PCR was conducted under standard enzyme and  
4 cycling conditions on a StepOne system, using custom-designed real-time assays and  
5 SYBR<sup>®</sup> green detection (PrimerDesign Ltd., UK) (Table 1). cDNA corresponding to  
6 6 ng of mRNA was used in each PCR reaction, and mixtures were prepared according  
7 to the manufacturer's instructions in 10 $\mu$ L triplicates for each target cDNA.  
8 Amplification was carried out in 96-well thermal cycle plates on a StepOne system  
9 (Applied Biosystems, USA). The data were analysed using a comparative Ct method  
10 by StepOne<sup>™</sup>. Gene expression levels were normalised with the housekeeper index.  
11 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) served as an endogenous  
12 control.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

### 24 25 26 27 **3. Results**

#### 28 29 30 31 *3.1 Implant Characterization*

32  
33  
34  
35  
36 The SEM image for the surface of the nanostructures is presented in Figure 1a  
37 and b; the image clearly shows that the surface harbours homogeneous  
38 nanostructures, covering the entire surface.  
39  
40  
41

42  
43 The mean  $S_a$  value (SD) was 0.28 (00.7);  $S_{ds}$  (SD) was 195,203 (7,871); and  
44  $S_{dr}$  percentage (SD) was 8.15 (0.53). There were no significant differences between  
45 the 2 groups with regard to any of the parameters. Figure 1c shows three-dimensional  
46 optical interferometry images of the surface.  
47  
48  
49  
50

#### 51 52 53 *3.2 Scanning Electron Microscopic Observation of the Retrieved Implants*

1  
2  
3 Figure 2a-d presents descriptive SEM images. In both implants, remnants of  
4 some bony tissue were visible; however, no remarkable differences were observed  
5 between the 2 groups.  
6  
7  
8  
9

### 10 11 12 *3.3 Gene Expression*

13  
14  
15  
16 The results of real-time RT-PCR are presented in Figure 3. In brief, the  
17 osteoblast markers that presented higher expression in the case of the test implants  
18 were RUNX-2 (1.62-fold), osteoclastin (1.53-fold), alkaline phosphatase (ALP) (1.97-  
19 fold), and collagen I (1.04-fold). On the other hand, the expression of IGF-1 was low  
20 (0.84-fold). In the case of the test implants, all osteoclast markers investigated in the  
21 present study showed high expression; tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)  
22 (1.67-fold), calcitonin receptor (1.35-fold), and ATPase (1.25-fold). The  
23 inflammatory markers that showed higher expression for the test implants than the  
24 control implants were IL-10 (1.53-fold) and TNF- $\alpha$  (1.61-fold), whereas IL-6 showed  
25 lower expression (0.59-fold).  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

## 42 **4. Discussion**

43  
44  
45 Protein doping is considered one of the promising means of surface  
46 modifications, and has been proven to improve osseointegration<sup>7,20,25,26</sup>. In most of  
47 these studies, the enhancing effect of protein doping has been confined to the early  
48 stages of healing and has not been proven to be of great significance for longer time  
49 periods. This interesting feature may contribute to the effect of competitive protein  
50 adsorption, and it is quite logical to speculate that proteins will only be effective in  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 the initial stages of osseointegration. Previously, we used a mouse model to evaluate  
4 the effect of protein (fibronectin) doping, and reported that when observing the  
5 localisation of doped proteins after the placement of an implant, localisation around  
6 the implant is most significant for up to 3 days and eventually vanishes<sup>7</sup>. However,  
7 according to the corresponding histology, rapid bone formation was seen during  
8 periods of prominent protein accumulation. Improvement and upregulation of the  
9 early bone responses are of great clinical importance, because the current trend of  
10 promoting early or immediate restoration demands improved bone responses at the  
11 implant interface. Hence, our focus and interest lay in observing the early stages of  
12 bone-to-implant interaction.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

24  
25 The results from the real-time RT-PCR analysis presented distinct differences  
26 between the nanostructured surface and the LN-1-coated implant. Evaluation of the  
27 selected osteoblastogenesis-related markers revealed that most of the markers showed  
28 higher expression in the case of the LN-1-coated implant. It is of great interest that the  
29 expression levels of ALP, RUNX-2, and collagen I were higher in the case of the LN-  
30 1-coated implant, because this is an indication of higher osteoprogenitor and  
31 osteoblast precursor activity<sup>27</sup>. In addition, the higher expression of osteocalcin, the  
32 specific marker for bone formation indicates that the differentiation activity of cells  
33 into osteoblasts had been upregulated<sup>28</sup>. IGF-1 is another major factor, which has  
34 been reported to promote osteoblast activity<sup>29</sup>, especially osteoblast proliferation<sup>30</sup>.  
35 However in the present study, IGF-1 expression was lower for the LN-1-coated  
36 implant, indicating that the proliferation activity at the interface was suppressed.  
37 Since IGF-1 expression can be affected by the interaction of different signalling  
38 pathways<sup>31</sup>, the relation between the pathways responsible for the enhanced  
39 differentiation as seen in the present study may be difficult to clarify. It has been  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 reported that osteoblast proliferation and differentiation activity may be at times  
4  
5 contradictory<sup>32,33</sup>, hence, the doped laminin may have suppressed proliferation, at the  
6  
7 same time through a different pathway, had upregulated differentiation.  
8

9  
10 All osteoclastic markers tested presented higher expression for the LN-1-  
11  
12 coated implant. There is a tendency for investigations, especially in the field of  
13  
14 material science, to focus on the behaviour of osteogenic genes. However, osteoclast-  
15  
16 mediated bone resorption around dental implants plays an important role in bone  
17  
18 remodelling<sup>34,35</sup>. It has been reported that osteoblastogenesis and osteoclastogenesis  
19  
20 transact and regulate each other through the receptor activator of nuclear factor-  
21  
22 kappaB ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin (OPG) system pathway<sup>36,37</sup>. It can  
23  
24 be speculated that the higher level of osteoblastic gene expression would likewise  
25  
26 induce higher osteoclastic gene expression. In the present study, the osteoclastic  
27  
28 activity may have been highly activated because of mutual interactions after doping  
29  
30 with laminin, because the osteoclasts express significantly high levels of  $\alpha_v\beta_3$  integrin,  
31  
32 which is known to be a collagen/laminin receptors<sup>38</sup>.  
33  
34  
35

36 Most of the inflammatory factors were upregulated for the LN-1-doped group.  
37  
38 Haapasalmi *et al.* (1995) has reported that laminin-1 localises where inflammation  
39  
40 exists, as seen in chronic periodontal inflammatory responses<sup>39</sup>. Because  
41  
42 inflammatory reactions are part of the healing process<sup>40</sup>, the induced inflammatory  
43  
44 gene expression may be an indication of vigorous osteogenesis at the implant  
45  
46 interface.  
47  
48

49 The SEM investigation revealed bone formation on both surfaces; however, it  
50  
51 was difficult to visibly distinguish differences. It is speculated that because of the  
52  
53 early time point, the mechanical attachment strength of the bone tissue to the implant  
54  
55 surface may be low, and the mineralisation could still be in progress. This can be  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 confirmed by the high gene expression of ALP, when the bone is still thought to be  
4 under maturation. For this reason, it can be assumed that a large segment of immature  
5 bony tissues may have detached from the implant interface, rather than development  
6 of a fracture within the bone. Because it was difficult to identify any morphological  
7 differences, the quality of the bony tissue is of great interest; further, gene expression  
8 determined by real-time RT-PCR showed that the gene behaviour was indeed specific  
9 to surface modification. The use of such detailed evaluation may further reveal the  
10 characteristics of various implant surface modifications, which may clarify the  
11 molecular aspect of osseointegration.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

## 24 25 **5. Conclusion**

26  
27 As compared to the non-coated nanostructured implant surface, the protein-doped  
28 nanostructured implant surface presented higher gene expression of typical genes  
29 involved in the osseointegration cascade. Evaluation of gene expression may help  
30 capture detailed differences, which were difficult to detect with the conventional  
31 evaluation techniques.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

## 40 41 **Acknowledgements**

42  
43 This study was supported by the Swedish Knowledge Foundation, the Swedish  
44 Research Council, and the Hjalmar Svensson Research Foundation. The authors  
45 would like to thank Neodent for the kind support. There were no conflicts of interest.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## REFERENCES

1. Turbill P, Beugeling T, Poot AA. Proteins involved in the Vroman effect during exposure of human blood plasma to glass and polyethylene. *Biomaterials* 1996;17(13):1279-87.
2. Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials* 2004;25(7-8):1429-38.
3. Jimbo R, Ono D, Hirakawa Y, Odatsu T, Tanaka T, Sawase T. Accelerated photo-induced hydrophilicity promotes osseointegration: an animal study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011;13(1):79-85.
4. Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2000;11(6):530-9.
5. Reddi AH. Implant-stimulated interface reactions during collagenous bone matrix-induced bone formation. *J Biomed Mater Res* 1985;19(3):233-9.
6. Jimbo R, Ivarsson M, Koskela A, Sul YT, Johansson CB. Protein adsorption to surface chemistry and crystal structure modification of titanium surfaces. *J Oral Maxillofac Res* 2010;1(3):e3.
7. Jimbo R, Sawase T, Shibata Y, Hirata K, Hishikawa Y, Tanaka Y, Bessho K, Ikeda T, Atsuta M. Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells. *Biomaterials* 2007;28(24):3469-77.
8. Schneider G, Burrige K. Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata. *Exp Cell Res* 1994;214(1):264-9.
9. Vroman L, Adams AL. Identification of rapid changes at plasma-solid interfaces. *J Biomed Mater Res* 1969;3(1):43-67.
10. Bentmann A, Kawelke N, Moss D, Zentgraf H, Bala Y, Berger I, Gasser JA, Nakchbandi IA. Circulating fibronectin affects bone matrix, whereas osteoblast fibronectin modulates osteoblast function. *J Bone Miner Res* 2010;25(4):706-15.
11. Guarnieri D, Battista S, Borzacchiello A, Mayol L, De Rosa E, Keene DR, Muscariello L, Barbarisi A, Netti PA. Effects of fibronectin and laminin on structural, mechanical and transport properties of 3D collagenous network. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18(2):245-53.
12. Sollazzo V, Palmieri A, Girardi A, Farinella F, Carcini F. Early effects of P-15 on human bone marrow stem cells. *J Oral Maxillofac Res* 2010;1(1).
13. Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 2006;27(32):5561-71.
14. Nagai M, Hayakawa T, Fukatsu A, Yamamoto M, Fukumoto M, Nagahama F, Mishima H, Yoshinari M, Nemoto K, Kato T. In vitro study of collagen coating of titanium implants for initial cell attachment. *Dent Mater J* 2002;21(3):250-60.
15. Hilbig H, Kirsten M, Rupietta R, Graf HL, Thalhammer S, Strasser S, Armbruster FP. Implant surface coatings with bone sialoprotein, collagen, and fibronectin and their effects on cells derived from human maxillar bone. *Eur J Med Res* 2007;12(1):6-12.
16. Cairns ML, Meenan BJ, Burke GA, Boyd AR. Influence of surface topography on osteoblast response to fibronectin coated calcium phosphate thin films. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;78(2):283-90.



17. Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials* 2010;31(4):706-13.
18. Tashiro K, Sephel GC, Greatorex D, Sasaki M, Shirashi N, Martin GR, Kleinman HK, Yamada Y. The RGD containing site of the mouse laminin A chain is active for cell attachment, spreading, migration and neurite outgrowth. *J Cell Physiol* 1991;146(3):451-9.
19. Wang Z, Telci D, Griffin M. Importance of syndecan-4 and syndecan -2 in osteoblast cell adhesion and survival mediated by a tissue transglutaminase-fibronectin complex. *Exp Cell Res* 2011;317(3):367-81.
20. Valderrama P, Jung RE, Thoma DS, Jones AA, Cochran DL. Evaluation of parathyroid hormone bound to a synthetic matrix for guided bone regeneration around dental implants: a histomorphometric study in dogs. *J Periodontol* 2010;81(5):737-47.
21. Kroese-Deutman HC, van den Dolder J, Spauwen PH, Jansen JA. Influence of RGD-loaded titanium implants on bone formation in vivo. *Tissue Eng* 2005;11(11-12):1867-75.
22. Kilpadi KL, Chang PL, Bellis SL. Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res* 2001;57(2):258-67.
23. Roche P, Goldberg HA, Delmas PD, Malaval L. Selective attachment of osteoprogenitors to laminin. *Bone* 1999;24(4):329-36.
24. Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, McKee MD. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 1998;40(2):324-35.
25. Ishibe T, Goto T, Kodama T, Miyazaki T, Kobayashi S, Takahashi T. Bone formation on apatite-coated titanium with incorporated BMP-2/heparin in vivo. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2009;108(6):867-875.
26. Wildemann B, Sander A, Schwabe P, Lucke M, Stockle U, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L-lactide)--growth factor coating for orthopaedic implants. *Biomaterials* 2005;26(18):4035-40.
27. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, Shaughnessy JD, Jr. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood* 2009;113(3):517-25.
28. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89(5):747-54.
29. Taniguchi T, Matsumoto T, Shindo H. Changes of serum levels of osteocalcin, alkaline phosphatase, IGF-I and IGF-binding protein-3 during fracture healing. *Injury* 2003;34(7):477-9.
30. Canalis E. Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest* 1980;66(4):709-19.
31. Sisci D, Morelli C, Cascio S, Lanzino M, Garofalo C, Reiss K, Garcia M, Russo A, Ando S, Surmacz E. The estrogen receptor alpha:insulin receptor substrate 1 complex in breast cancer: structure-function relationships. *Ann Oncol* 2007;18 Suppl 6:vi81-5.
32. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2004;93(6):1210-30.



- 1
- 2
- 3 33. Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN. High
- 4 concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the
- 5 differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro:
- 6 relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)*
- 7 2001;40(1):74-83.
- 8
- 9 34. Minkin C, Marinho VC. Role of the osteoclast at the bone-implant interface.
- 10 *Adv Dent Res* 1999;13:49-56.
- 11 35. Monjo M, Lamolle SF, Lyngstadaas SP, Ronold HJ, Ellingsen JE. In vivo
- 12 expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of
- 13 fluoride-modified titanium implants. *Biomaterials* 2008;29(28):3771-80.
- 14 36. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis*
- 15 *Res Ther* 2007;9 Suppl 1:S1.
- 16 37. Roodman GD. Bone-breaking cancer treatment. *Nat Med* 2007;13(1):25-6.
- 17 38. Rodan SB, Rodan GA. Integrin function in osteoclasts. *J Endocrinol* 1997;154
- 18 *Suppl*:S47-56.
- 19 39. Haapasalmi K, Makela M, Oksala O, Heino J, Yamada KM, Uitto VJ, Larjava
- 20 H. Expression of epithelial adhesion proteins and integrins in chronic
- 21 inflammation. *Am J Pathol* 1995;147(1):193-206.
- 22
- 23 40. Araujo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth
- 24 extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*
- 25 2005;32(2):212-8.
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

## Figure Legends

### Figure 1

SEM micrographs of nano-roughened implant surface; (a) magnification  $\times 5,000$ , and (b) 32,000. The magnified image shows that the surface is covered with nanometre structures. (c) 3D reconstructed interferometer image of the corresponding implant surface (Measurement area: 260mm  $\times$  200 mm).

### Figure 2

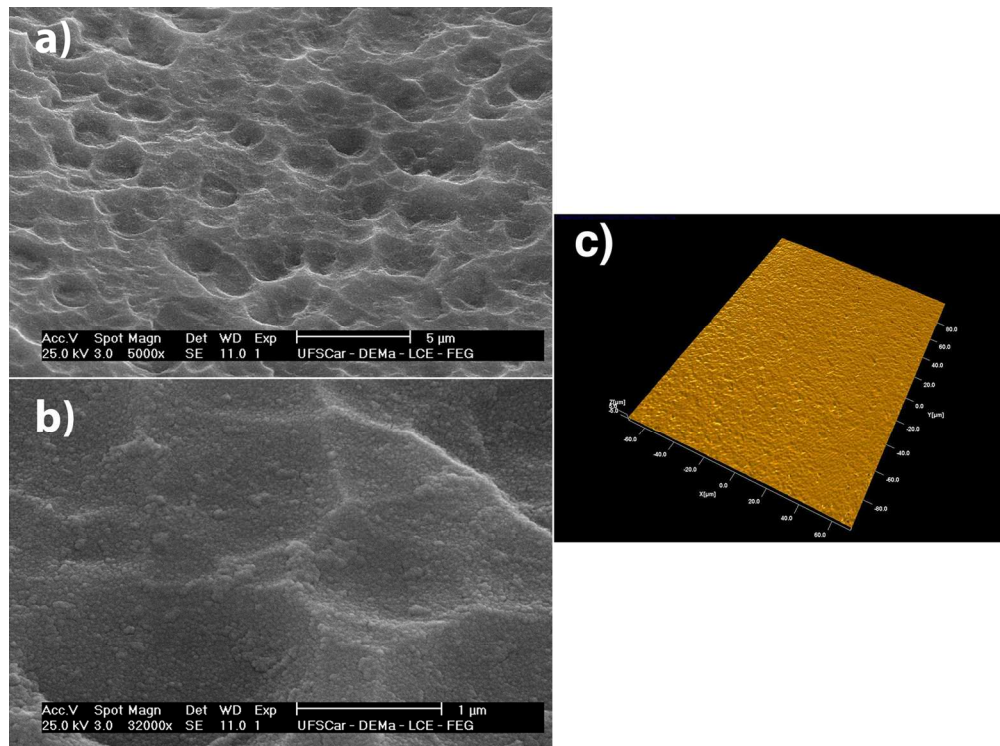
SEM micrographs of removed implants for (a) nano-roughened implant surface (control), (b) nano-roughened implant surface + Laminin (test) (magnification  $\times 500$ ), (c) further magnified image of the nano-roughened implant surface (control), and (d) further magnified image of the nano-roughened implant surface + Laminin (test) (magnification  $\times 5000$ ).

### Figure 3

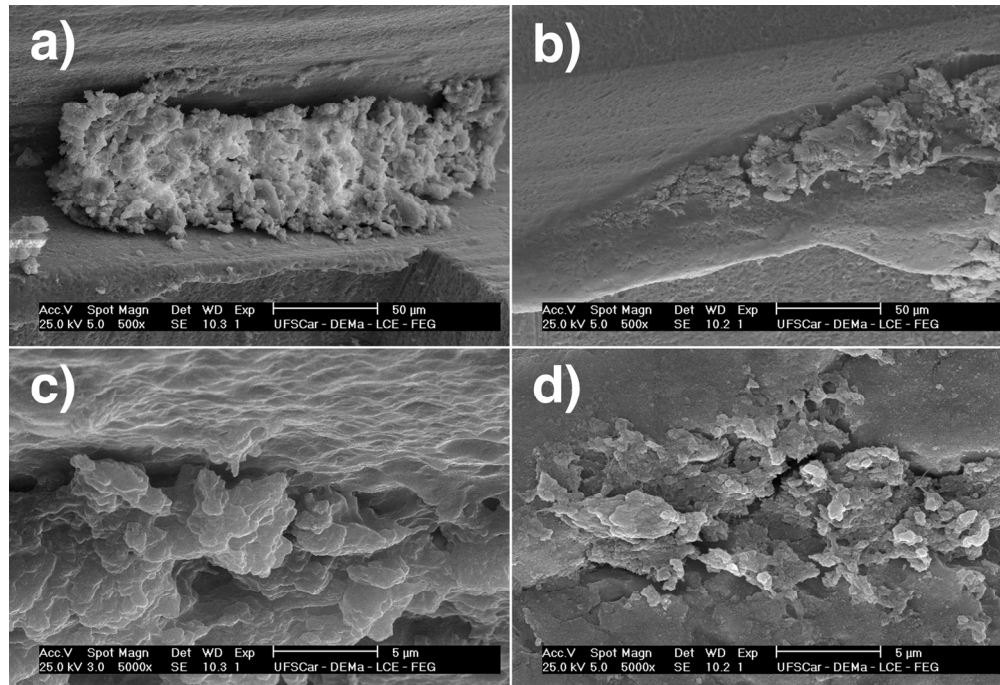
Gene expression of the markers evaluated by real-time RT-PCR. After 2 weeks, the surrounding tissues of implants were collected and total RNA of pooled samples was isolated. The osteogenic markers (ALP, osteocalcin, Runx2, calcitonin receptor, collagen I, TRAP, IGF-1 and ATPase) and inflammation markers (IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$ ) were analyzed. The relative expressions of target genes were normalized with housekeeping gene  $\beta$ -actin.

### Table 1

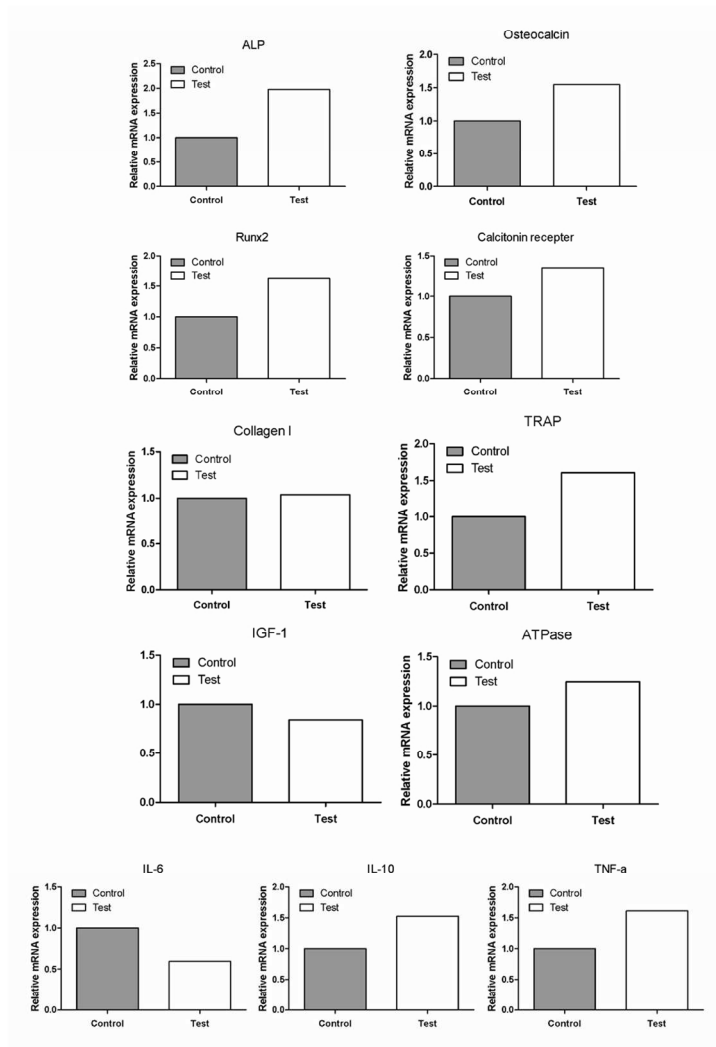
Primers used and specific parameters of the real-time PCR.



SEM micrographs of nano-roughened implant surface; (a) magnification  $\times 5,000$ , and (b)  $32,000$ . The magnified image shows that the surface is covered with nanometre structures. (c) 3D reconstructed interferometer image of the corresponding implant surface (Measurement area:  $260\text{mm} \times 200\text{mm}$ ).  $150 \times 111\text{mm}$  ( $300 \times 300\text{ DPI}$ )



SEM micrographs of removed implants for (a) nano-roughened implant surface (control), (b) nano-roughened implant surface + Laminin (test) (magnification  $\times 500$ ), (c) further magnified image of the nano-roughened implant surface (control), and (d) further magnified image of the nano-roughened implant surface + Laminin (test) (magnification  $\times 5000$ ).  
150x102mm (300  $\times$  300 DPI)



Gene expression of the markers evaluated by real-time RT-PCR. After 2 weeks, the surrounding tissues of implants were collected and total RNA of pooled samples was isolated. The osteogenic markers (ALP, osteocalcin, Runx2, calcitonin receptor, collagen I, TRAP, IGF-1 and ATPase) and inflammation markers (IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$ ) were analyzed. The relative expressions of target genes were normalized with housekeeping gene  $\beta$ -actin.

99x145mm (300 x 300 DPI)

**Table 1.**  
Primers used and specific parameters of the real-time PCR.

Gene		Primer sequence	T <sub>m</sub> amplicon (C°)	Amplicon Size (bp)	Primer source
ALP	S	5'-TGGACCTCGTGGACATCTG-3'	75	80	Oryctolagus cuniculus
	A	5'-CAGGAGTTCAGTGC GG TTC-3'			
ATPase	S	5'-CCTGGCTATTGGCTGTTACG-3'	77.7	98	Oryctolagus cuniculus
	A	5'-GCTGGTAGAAGGACACTCTTG-3'			
Calcitonin receptor	S	5'-CGTTCACCTCTGAAA CTACA-3'	72.6	128	Oryctolagus cuniculus
	A	5'-GCAACCAAGACTAATGAAACA-3'			
Collagen-I	S	5'-GGAAACGATGGTGCTACTGG-3'	80.4	83	Oryctolagus cuniculus
	A	5'-CCGACAGCTCCAGGGAAG-3'			
IGF-1	S	5'-CCGACATGCCAAGACTCA-3'	70.3	81	Oryctolagus cuniculus
	A	5'-TACTTCCTTTCTTCTCTCTGA-3'			
IL-6	S	5'-GAGGAAAGAGATGTGTGACCAT-3'	73.5	104	Oryctolagus cuniculus
	A	5'-AGCATCCGCTTCTTCTATCAG-3'			
Osteocalcin	S	5'-GCTCAHCCTTCGTGTCCAAG-3'	77.8	70	Oryctolagus cuniculus
	A	5'-CCGTGATCAGTTGGCGC-3'			
RUNX-2	S	5'-GCAGTCCCAAGCATTTCATC-3'	72.8	81	Oryctolagus cuniculus
	A	5'-GTGTAAGTAAAGGTGGCTGGATA-3'			
TNF- $\alpha$	S	5'-CTCACTACTCCCAGGTTCTCT-3'	78.2	122	Oryctolagus cuniculus
	A	5'-TTGATGGCAGAGAGGAGGTT-3'			
TRAP	S	5'-GCTACCTCCGCTTCCACTA-3'	78.5	129	Oryctolagus cuniculus
	A	5'-GCAGCCTGGTCTTGAAGAG-3'			
$\beta$ -actin	S	5'-CACCTGATGCTCAAGTACC-3'	76.4	96	Oryctolagus cuniculus
	A	5'-CGCAGCTCGTTGTAGAAGG-3'			

view

## 6 Considerações finais

Evidências de que as alterações de topografia podem estimular e guiar vários processos moleculares e biológicos na osseointegração tem estimulado o desenvolvimento de superfícies de implantes na escala micro e nanométrica. O objetivo do presente estudo foi de avaliar a influência da modificação de superfícies de titânio na escala nanométrica em importantes eventos do processo biológico da osteogênese. O processo de osseointegração e de formação de matriz mineralizada foi observado *in vitro* e *in vivo* como um fator relacionado com as possíveis falhas no processo de formação óssea, a nicotina e o fumo. A influência na expressão de citocinas inflamatórias foi observada em um modelo *in vitro* de cultura de fibroblastos gengivais humanos sobre discos de titânio. E com o intuito de observar as respostas morfológicas e moleculares da modificação química na superfície com nanotopografia através da incorporação da proteína laminina-1, um estudo *in vivo* em coelhos também foi realizado.

Estudos *in vivo*<sup>20, 50, 65</sup>, *in vitro*<sup>11, 14, 41, 45, 60</sup> e em humanos<sup>10, 25, 62</sup> mostraram que modificações na superfície podem acelerar e aumentar o contato osso implante. Em relação às superfícies avaliadas nesse trabalho foi observado que a modificações na escala nanométrica apresentaram resultados significativamente superiores a respeito de: maior formação de matriz mineralizada, aumento no contato osso-

implante (BIC), modulação da expressão de citocinas e expressão de genes relacionados com a osseointegração.

Em relação às superfícies, a caracterização através da análise dos parâmetros na escala micro e nanométrica, assim como sua química, são de fundamental importância. Somente com a correta caracterização das mesmas é possível a discussão das potenciais vantagens, e o entendimento do mecanismo responsável pelo aumento da formação óssea. Os resultados mostraram que o processo de obtenção das topografias não provocou nenhuma diferença na química entre as superfícies estudadas. Quanto à rugosidade foi observado que as superfícies possuem uma rugosidade mínima, sendo diferenciada pela presença ou não de micro estruturas e nanoestruturas observadas com o auxílio das imagens de SEM e AFM.

O sucesso do tratamento com implantes dentários se encontra muito bem documentado na literatura, entretanto casos de falha e perda de implantes podem ser observados. Condições locais e sistêmicas estão diretamente envolvidas na maioria dos casos em que essas falhas são observadas. Entre os possíveis fatores relacionados com as falhas o fumo é um dos mais abordados. Estudos clínicos demonstram que fumantes não apresentam somente altas taxas de perda de implantes, mas também uma elevada incidência de peri-implantite e perda óssea marginal. Poucos estudos, no entanto, avaliam a influência das superfícies dos



implantes na presença de fatores deletérios e a possibilidade de se observar uma diminuição das suas conseqüências.

O efeito da alteração de superfície sobre a osseointegração na presença de fatores locais como o hábito de fumar ainda é uma questão pouco abordada. In vivo a administração de nicotina sistêmica em coelhos não mostrou diferenças significativas no contato osso-implante<sup>63</sup>. Entretanto a inalação intermitente da fumaça do cigarro pode mostrar diferenças significantes, pois existem outros metabólitos presentes na fumaça do cigarro capazes de diminuir a formação óssea. O contato através da inalação intermitente em ratos provoca uma formação menor do contato osso-implante e uma formação óssea de menor qualidade ao redor do implante, quando comparado com a administração sistêmica de nicotina<sup>9</sup>. Estudos mostram que a formação óssea trabecular é menor em pacientes fumantes, e que a falha dos implantes pode ser uma conseqüência tardia após a aplicação de carga<sup>18</sup>. Modificações na superfície poderiam favorecer a formação óssea prevenindo ou reduzindo essa possível falha. No entanto avaliações in vitro e in vivo comparando diferentes superfícies de titânio e as suas relações com o hábito de fumar são escassas.

No modelo utilizado por nós os resultados demonstraram que in vivo micro e nanotopografia favorecem um maior contato osso-implante, reduzindo os efeitos deletérios causados pela exposição intermitente a

fumaça de cigarros. Estudos prévios utilizando diferentes topografias mostraram resultados similares com os observados em relação a uma menor formação óssea em animais submetidos à inalação intermitente da fumaça de cigarro e cultura de osteoblastos com a adição da mesma concentração de nicotina no meio. O fato dos estudos não abordarem superfícies com nanotopografia dificulta uma maior comparação dos resultados obtidos. Entretanto, considerando os resultados para a microtopografia e os dados gerais do estudo como, por exemplo, a concentração obtida de nicotina no sangue dos animais, fica evidente a reprodutibilidade desta metodologia.

Esses resultados reforçam o pensamento que modificações nas superfícies de titânio alteraram o padrão de mineralização óssea. Alterações de micro e a nanotopografia favorecem uma maior formação de matiz mineralizada in vitro, e um maior contato osso-implante in vivo. A inalação intermitente de fumaça de cigarro prejudica a formação óssea, entretanto, in vitro a nicotina, na concentração utilizada, não se mostrou capaz de prejudicar o processo de mineralização, sugerindo que outros componentes presentes na fumaça derivada da queima do cigarro, ou a combinação deles, possam prejudicar o metabolismo ósseo e o processo de osseointegração.

Diversos efeitos deletérios locais e sistêmicos associados ao hábito de fumar são mais do que conhecidos, o que nos leva a conclusão que

evitar o seu consumo continua sendo a melhor forma de combatê-los. Apesar dos resultados demonstrarem que a utilização de superfícies com nanotopografia pode suprir uma menor formação óssea ao redor de implantes na presença do fator fumo, e que a utilização dessas superfícies em fumantes pareça ser recomendada, a devida cautela é necessária na interpretação dos resultados. Estudos clínicos utilizando implantes com nanotopografia em pacientes fumantes devem ser realizados para tal afirmação.

A respeito da relação das superfícies com a resposta inflamatória tecidual sabe-se da importância em relação ao processo de reparo nos tecidos adjacentes aos implantes<sup>52</sup>. A topografia das superfícies dos implantes esta diretamente relacionada com o comportamento de diferentes tipos celulares. Dentre os diferentes tipos de células envolvidas no processo de formação dos tecidos peri-implantares, os fibroblastos desempenham um fundamental papel na síntese do tecido conjuntivo rico em colágeno ao redor de implantes dentários<sup>34, 36</sup>. Fibroblastos também estão diretamente relacionados com a resposta inflamatória, com a remodelação dos tecidos, com a formação e manutenção do espaço biológico e com reabsorção óssea ao redor de implantes<sup>22, 50, 71</sup>.

Compreender a relação dos fibroblastos e da resposta inflamatória perante as diferentes superfícies de titânio, visando o entendimento do seu real papel nos eventos já citados, tem sido o foco de recentes

estudos. Pesquisas apontam que a topografia pode possuir um papel importante para a regulação dos eventos inflamatórios<sup>35, 48</sup>. E já foi demonstrado que a topografia é capaz de influenciar a resposta de fibroblastos in vitro, e que também pode induzir benefícios clínicos no que diz respeito a ambos os tecidos, mole e duro<sup>72</sup>.

Os resultados demonstram que em cultura de fibroblastos gengivais humanos a topografia tem influência no padrão de expressão de citocinas. Foi observado um aumento na produção de IL-6 e IL-8 pelos fibroblastos em todas as superfícies estudadas em 24h. Com uma redução significativamente maior para a IL-6 nas superfícies tratadas em relação à superfície usinada. Por outro lado a produção de IL-8 foi menor apenas na superfície com micro + nanotopografia comparadas com a superfície usinada. E com relação a IL-4 não houve um aumento significativo em 48h apenas na superfície com micro + nanotopografia, entretanto seus níveis foram mais altos em 24 e 48 h quando comparada com as outras superfícies. Os resultados sugerem que a associação de micro + nanotopografia pode trazer benefícios em comparação com as outras superfícies estudadas uma vez que IL-8, interleucina inflamatória, foi expressa de forma reduzida e a IL-4, citocina antiinflamatórias, teve sua expressão significativamente maior. Os mecanismos pelos quais as superfícies modulam a expressão de diferentes marcadores celulares ainda não são bem conhecidos. Estudos biomoleculares dos efeitos celulares das características das superfícies estão se tornando mais

freqüentes e devem ajudar a esclarecer os eventos relacionados com a sinalização celular<sup>17</sup>.

Com relação à modificação química das superfícies de titânio através da incorporação de proteínas, sabe-se que esse tipo de tratamento é uma das promissoras modificações que estão sendo desenvolvidas. Estudos comprovam que esses métodos são viáveis e colaboram para uma melhora na osseointegração<sup>27, 31, 68, 75</sup>. Na maioria dos estudos os resultados favoráveis estão relacionados com os períodos iniciais do reparo não sendo confirmados em períodos tardios. Indicando que as proteínas contribuem efetivamente nos eventos iniciais da osseointegração. E devido a isso uma grande importância é dada pelo ponto de vista clínico, o qual busca promover tratamentos mais rápidos ou imediatos aos pacientes submetidos à terapia com implantes.

Os resultados das análises por RT-PCR mostram diferenças entre as superfícies nanoestruturadas com laminina-1 incorporada. Nessa superfície a maioria dos marcadores osteogênicos teve sua expressão aumentada, como ALP, RUNX-2, colágeno tipo-1 e osteocalcina o que sugere uma maior atividade osteoblástica. Vale aqui ressaltar a importância de se estudar os aspectos moleculares nas modificações de superfície relacionados a osseointegração para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesse processo. Os resultados mostram que a incorporação de laminina-1 pode influenciar a expressão gênica de

moléculas envolvidas na cascata da osseointegração, favorecendo os resultados no período inicial do reparo.

Os resultados do presente estudo mostraram que a nanoestrutura de superfícies de titânio pode afetar importantes parâmetros da osteogênese in vivo e in vitro. Considerando que a nanotopografia favorece o aumento da osteogênese de contato in vivo e pode regular a expressão de citocinas inflamatórias in vitro, e reduzir a consequência de efeitos deletérios como o fumo, outros estudos deverão ser desenvolvidos objetivando a comparação da quantidade/qualidade da formação óssea sobre a nanotopografia, com o intuito de verificar se os resultados apresentados neste trabalho e em estudos iniciais in vivo podem ser reproduzidos consistentemente em outras condições experimentais.

A osseointegração sobre superfícies de titânio tem sido extensamente investigada, entretanto, 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 da maneira mais adequada para alcançarmos a “superfície ideal”. Atualmente, o que tem sido buscado com as pesquisas na área é o conhecimento para desenvolver procedimentos mais rápidos, controlados e que resultem em maior conforto e previsibilidade para profissional e paciente. Todos esses

aspectos devem ser considerados no desenvolvimento de novas superfícies.

## 7 Conclusão

Os resultados obtidos, frente à metodologia empregada permitiram concluir que:

*1.* A nanotopografia favorece uma maior formação de matriz mineralizada in vitro, e a presença da nicotina, na concentração utilizada, não é capaz de prejudicar o processo de mineralização da cultura primária de osteoblastos derivados da calvária de ratos;

*2.* A nanotopografia é capaz de aumentar o contato osso-implante (BIC) mesmo na presença da inalação intermitente da fumaça de cigarro; e foi capaz de reduzir, porem não totalmente, seus efeitos deletérios e uma menor formação óssea em um modelo animal em ratos;

*3.* A nanotopografia de titânio pode ter papel importante na modulação da resposta inflamatória e na expressão de citocinas. Sendo que a associação da micro + nanotopografia mostrou uma redução da expressão da IL-8 e um aumento da expressão da IL-4 em cultura celular de fibroblastos gengivais humanos;

*4.* A incorporação de laminina-1 (LN-1) a superfície de titânio com nanotopografia demonstrou favorecer uma maior expressão de importantes genes envolvidos na cascata da osseointegração em um modelo animal em coelhos.



## 8 Referências\*

1. Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. *Periodontol 2000*. 2008;47:15-26.
2. Alvim-Pereira F, Montes CC, Thome G, Olandoski M, Trevilatto PC. Analysis of association of clinical aspects and vitamin D receptor gene polymorphism with dental implant loss. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19:786-95.
3. Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993;8:609-15.
4. Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16:268-76.
5. Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16:389-95.
6. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int*. 1986;38:143-54.
7. Bornstein MM, Schmid B, Belser UC, Lussi A, Buser D. Early loading of non-submerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. 5-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16:631-8.

\* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

8. Cesar-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20:713-9.
9. Cesar-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H, Jr., Nociti FH, Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol*. 2003;74:1454-9.
10. Cochran DL, Buser D, ten Bruggenkate CM, Weingart D, Taylor TM, Bernard JP, 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*. 2002;13:144-53.
11. Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res*. 1998;40:1-11.
12. Correa MG, Campos ML, Benatti BB, Marques MR, Casati MZ, Nociti FH, Jr., et al. The impact of cigarette smoke inhalation on the outcome of enamel matrix derivative treatment in rats: histometric analysis. *J Periodontol*. 2010;81:1820-8.
13. Correa MG, Gomes Campos ML, Cesar-Neto JB, Casati MZ, Nociti FH, Sallum EA. Histometric evaluation of bone around titanium implants with different surface treatments in rats exposed to cigarette smoke inhalation. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20:588-93.

14. Dalby MJ, Riehle MO, Johnstone H, Affrossman S, Curtis AS. In vitro reaction of endothelial cells to polymer demixed nanotopography. *Biomaterials*. 2002;23(14):2945-54.
15. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. 1998;11:391-401.
16. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol*. 1982;11:318-26.
17. Donos N, Hamlet S, Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Bosshardt DD, et al. Gene expression profile of osseointegration of a hydrophilic compared with a hydrophobic microrough implant surface. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22:365-72.
18. Ekfeldt A, Christiansson U, Eriksson T, Linden U, Lundqvist S, Rundcrantz T, et al. A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12:462-7.
19. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci*. 1998;106:721-64.
20. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E, Jr. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67:1706-15.

21. Frojd V, Wennerberg A, Franke Stenport V. Importance of Ca(2+) modifications for osseointegration of smooth and moderately rough anodized titanium implants - a removal torque and histological evaluation in rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010.Oct 26. [Epub ahead of print]
22. Glauser R, Ruhstaller P, Windisch S, Zembic A, Lundgren A, Gottlow J, et al. Immediate occlusal loading of Branemark System TiUnite implants placed predominantly in soft bone: 4-year results of a prospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2005;7 (Suppl 1):S52-9.
23. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol.* 1993;64:16-23.
24. Hinode D, Tanabe S, Yokoyama M, Fujisawa K, Yamauchi E, Miyamoto Y. Influence of smoking on osseointegrated implant failure: a meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17:473-8.
25. Iezzi G, Degidi M, Scarano A, Perrotti V, Piattelli A. Bone response to submerged, unloaded implants inserted in poor bone sites: a histological and histomorphometrical study of 8 titanium implants retrieved from man. *J Oral Implantol.* 2005;31:225-33.
26. Irie K, Zalzal S, Ozawa H, McKee MD, Nanci A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. *Anat Rec.* 1998;252:554-67.

27. Ishibe T, Goto T, Kodama T, Miyazaki T, Kobayashi S, Takahashi T. Bone formation on apatite-coated titanium with incorporated BMP-2/heparin in vivo. *Oral surg oral med oral pathol oral radiol endod.* 2009;108:867-75.
28. Jimbo R, Coelho PG, Vandeweghe S, Schwartz-Filho HO, Hayashi M, Ono D, et al. Histological and three-dimensional evaluation of osseointegration into nanostructured calcium phosphate-coated implants. *Acta Biomater.* 2011.Jul 21. [Epub ahead of print]
29. Jimbo R, Ivarsson M, Koskela A, Sul YT, Johansson CB. Protein adsorption to surface chemistry and crystal structure modification of titanium surfaces. *J Oral Maxillofac Res.* 2010;1:e3.
30. Jimbo R, Ono D, Hirakawa Y, Odatsu T, Tanaka T, Sawase T. Accelerated photo-induced hydrophilicity promotes osseointegration: an animal study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2011;13:79-85.
31. Jimbo R, Sawase T, Shibata Y, Hirata K, Hishikawa Y, Tanaka Y, et al. Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells. *Biomaterials.* 2007;28(24):3469-77.
32. Jimbo R, Sotres J, Johansson C, Breiding K, Currie F, Wennerberg A. The biological response to three different nanostructures applied on smooth implant surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2011. Apr 13. [Epub ahead of print]

33. Kilpadi KL, Chang PL, Bellis SL. Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res.* 2001;57:258-67.
34. Kim H, Murakami H, Chehroudi B, Textor M, Brunette DM. Effects of surface topography on the connective tissue attachment to subcutaneous implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21:354-65.
35. Kloss FR, Steinmuller-Nethl D, Stigler RG, Ennemoser T, Rasse M, Hachl O. In vivo investigation on connective tissue healing to polished surfaces with different surface wettability. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22:699-705.
36. Kokubu E, Hamilton DW, Inoue T, Brunette DM. Modulation of human gingival fibroblast adhesion, morphology, tyrosine phosphorylation, and ERK 1/2 localization on polished, grooved and SLA substratum topographies. *J Biomed Mater Res A.* 2009;91:663-70.
37. Lambert PM, Morris HF, Ochi S. The influence of smoking on 3-year clinical success of osseointegrated dental implants. *Ann Periodontol.* 2000;5:79-89.
38. Meechan JG, Macgregor ID, Rogers SN, Hobson RS, Bate JP, Dennison M. The effect of smoking on immediate post-extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1988;26:402-9.

39. Morandini AC, Sipert CR, Gasparoto TH, Gregghi SL, Passanezi E, Rezende ML, et al. Differential production of macrophage inflammatory protein-1alpha, stromal-derived factor-1, and IL-6 by human cultured periodontal ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolysaccharide from *P. gingivalis*. *J Periodontol*. 2010;81:310-7.
40. Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF-beta, interleukin (IL)-8 and IL-10. *Braz Oral Res*. 2011;25:157-62.
41. Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res*. 1998;40:324-35.
42. Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech*. 1996;33:214-31.
43. Nociti FH, Jr., Cesar NJ, Carvalho MD, Sallum EA. Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation: a histometric study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17:347-52.
44. Nociti Junior FH, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol*. 2002;73:982-7.

45. Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004;25:403-13.
46. Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem*. 2003;51:633-41.
47. Ostman PO, Hellman M, Sennerby L. Immediate occlusal loading of implants in the partially edentate mandible: a prospective 1-year radiographic and 4-year clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23:315-22.
48. Palmquist A, Johansson A, Suska F, Branemark R, Thomsen P. Acute Inflammatory Response to Laser-Induced Micro- and Nano-Sized Titanium Surface Features. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011. Jul 11 [Epub ahead of print]
49. Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface*. 2010;7 (Suppl 5):S515-27.
50. Papalexiou V, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Souza SS, Taba M, Jr., Kajiwarra JK. 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*. 2004;15:44-53.



51. Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11:530-9.
52. Peltroche-Llacsahuanga H, Schmidt S, Schnitzler N, Lutticken R, Haase G. Simultaneous measurement of biopolymer-mediated Mac-1 up-regulation and adherence of neutrophils: a novel flow cytometric approach for predicting initial inflammatory interaction with foreign materials. *J Immunol Methods.* 2001;258:13-25.
53. Porter JA, von Fraunhofer JA. Success or failure of dental implants? A literature review with treatment considerations. *Gen Dent.* 2005;53:423-32; quiz 33, 46.
54. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials.* 1999;20(23-24):2311-21.
55. Rasmusson L, Roos J, Bystedt H. A 10-year follow-up study of titanium dioxide-blasted implants. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2005;7:36-42.
56. Reddi AH. Implant-stimulated interface reactions during collagenous bone matrix-induced bone formation. *J Biomed Mater Res.* 1985;19:233-9.
57. Rosa AL, Beloti MM. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:43-8.

58. Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials*. 2004;25:1429-38.
59. Schneider G, Burrige K. Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata. *Exp Cell Res*. 1994;214:264-9.
60. Schwartz Fo HO, Novaes AB, Jr., de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18:333-44.
61. Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem*. 1994;56:340-7.
62. Shibli JA, Grassi S, de Figueiredo LC, Feres M, Marcantonio E, Jr., Iezzi G, et al. Influence of implant surface topography on early osseointegration: a histological study in human jaws. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;80:377-85.
63. Stefani CM, Nogueira F, Sallum EA, de TS, Sallum AW, Nociti FH, Jr. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. *J Periodontol*. 2002;73:206-12.
64. Tashiro K, Sephel GC, Greatorex D, Sasaki M, Shirashi N, Martin GR, et al. The RGD containing site of the mouse laminin A chain is active for cell attachment, spreading, migration and neurite outgrowth. *J Cell Physiol*. 1991;146:451-9.

65. Tavares MG, de Oliveira PT, Nanci A, Hawthorne AC, Rosa AL, Xavier SP. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhances contact osteogenesis. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18:452-8.
66. Turbill P, Beugeling T, Poot AA. Proteins involved in the Vroman effect during exposure of human blood plasma to glass and polyethylene. *Biomaterials.* 1996;17(13):1279-87.
67. Ueng SW, Lee MY, Li AF, Lin SS, Tai CL, Shih CH. Effect of intermittent cigarette smoke inhalation on tibial lengthening: experimental study on rabbits. *J Trauma.* 1997;42:231-8.
68. Valderrama P, Jung RE, Thoma DS, Jones AA, Cochran DL. Evaluation of parathyroid hormone bound to a synthetic matrix for guided bone regeneration around dental implants: a histomorphometric study in dogs. *J Periodontol.* 2010;81:737-47.
69. Wang Z, Telci D, Griffin M. Importance of syndecan-4 and syndecan-2 in osteoblast cell adhesion and survival mediated by a tissue transglutaminase-fibronectin complex. *Exp Cell Res.* 2011;317:367-81.
70. Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15:331-44.
71. Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25:63-74.

72. Wennerberg A, Frojd V, Olsson M, Nannmark U, Emanuelsson L, Johansson P, et al. Nanoporous TiO<sub>2</sub> thin film on titanium oral implants for enhanced human soft tissue adhesion: a light and electron microscopy study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011;13:184-96.
73. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res*. 1998;9:11-9.
74. Weyant RJ. Characteristics associated with the loss and peri-implant tissue health of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994;9:95-102.
75. Wildemann B, Sander A, Schwabe P, Lucke M, Stockle U, Raschke M, et al. Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L-lactide)--growth factor coating for orthopaedic implants. *Biomaterials*. 2005;26(18):4035-40.

Anexo



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA


Proc. CEEA nº 19/2008

Araraquara, 07 de outubro de 2008

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 06/10/2008, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Avaliação do efeito do fumo na osteogênese sobre diferentes superfícies de titânio. Estudo in vitro e in vivo" (Proc. CEEA nº 19/2008) **AUTORIZA** a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do **RELATÓRIO FINAL (OUTUBRO/2010)**

Atenciosamente.

  
**Profa. Dra. ELENY BALDUCCI ROSLINDO**  
Coordenadora do CEEA

À

**Profª Drª ROSEMARY ADRIANA CHIÉRICI MARCANTONIO**

Pesquisador Responsável

a/c Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira e Humberto Schwartz Filho

Nesta

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 19 de setembro de 2011.

**HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO**