

Efeito de Superfícies de Implantes Nano-Estruturadas na Expressão de Genes de Osteoblastos e no Contato Osso-Implante In Vivo

Effect of Nanostructured Implant Surfaces on Osteoblast Related Gene Expression and Bone-Implant Contact In Vivo

Gustavo MENDONÇA¹, Daniela B. S. MENDONÇA², Luis Gustavo P. SIMÕES³, André Luiz ARAÚJO³, Alexsander Luis GOLIN⁴, Wagner R. DUARTE⁵, Lyndon F. COOPER⁶, Francisco José L. ARAGÃO⁷

1- Professor Assistente, Bone Biology and Implant Therapy Laboratory, Department of Prosthodontics, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA. Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília;

2- Pós-doutorando, Bone Biology and Implant Therapy Laboratory, Department of Prosthodontics, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA. Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília;

3- Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, São Carlos, SP;

4- Departamento de Engenharia Mecânica, Escola de Engenharia Mecânica da Pontifícia Universidade Católica de Curitiba – PUC-PR. Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico – ILAPEO;

5- Professor Adjunto, Curso de Graduação em Odontologia, Universidade de Brasília;

6- Professor Doutor, Bone Biology and Implant Therapy Laboratory, Department of Prosthodontics, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA;

7- Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Professor doutor, Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília;

RESUMO

As tendências atuais na terapia com implantes odontológicos têm incluído o uso de implantes com superfícies modificadas utilizando nanotecnologia. Ciência que permite a construção de novos materiais e dispositivos pela manipulação de átomos individuais e moléculas (escala menor do que 100nm). O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel das modificações em escala nanométrica de superfícies de implantes osseointegrados para melhorar o processo de osseointegração. Nanotecnologia oferece a engenheiros e profissionais da área de biologia e saúde novos meios para entender e otimizar funções e respostas específicas de células. As várias técnicas utilizadas para adicionar características nanométricas às superfícies de implantes osseointegrados são descritas neste trabalho. Vários trabalhos tem apresentado os efeitos da nanotecnologia na modulação

de etapas fundamentais do processo de osseointegração. As vantagens e desvantagens da utilização da nanotecnologia na superfície de implantes também são discutidas nesse trabalho. Posteriormente, em uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo*, foi possível avaliar o efeito específico destas modificações em dois diferentes modelos. Como efeitos observados da aplicação de nanoestruturas à superfície dos implantes osseointegrados foi possível verificar-se uma melhor e mais rápida resposta de osseointegração destes materiais, atuando efetivamente na cascata de diferenciação de osteoblastos.

PALAVRAS-CHAVE: Nanotecnologia, nanotopografia, implante dental, tratamento de superfície, regeneração óssea, sinalização celular

INTRODUÇÃO

Nanotecnologia é a aplicação de ciência e engenharia em escala atômica. Esta tecnologia facilita a construção de novos materiais e dispositivos pela manipulação de átomos individuais e moléculas e permite a construção átomo por átomo de minúsculas estruturas (1–100nm), as quais têm novas propriedades e grandes aplicações nas ciências da saúde e biotecnologia. Embora muitas definições estejam ligadas ao termo “nanomaterial”, esta definição está relacionada aos materiais com topografia, em pelo menos uma dimensão, variando de 1 a 100nm (nanoestruturado), e de acordo com a forma pode ser dividido em sólidos cristalinos com o tamanho dos grãos variando de 1 a

100nm (nanocristais), camadas superficiais únicas ou múltiplas com espessura de 1 a 10nm (nanorevestimentos), pós extremamente finos com partículas variando de 1 a 100nm (nanopós) e fibras também com diâmetro na faixa de 1 a 100nm (nanofibras). Nos implantes osseointegrados o desenvolvimento de superfícies nano-estruturadas pode aumentar consideravelmente a adesão de células ósseas e também a produção de matriz óssea necessária no processo de mineralização e manutenção do osso que circunda o implante¹⁻¹⁰. Até o presente momento, embora se tenha conhecimento sobre as vantagens das superfícies nano-estruturadas, poucos sistemas de implantes dentários osseointegrados disponíveis comercialmente no mercado tem utilizado

essa tecnologia na elaboração de seus produtos.

Devido ao fato de também na natureza serem encontradas várias estruturas na escala nanométrica, inclusive no corpo humano, é que a nanotecnologia se torna tão importante em termos biológicos. O tecido ósseo é composto de numerosos materiais como colágeno e hidroxiapatita, que se encontram em escala nanométrica, e provém uma adequada estrutura para a interação celular. Embora a confecção de materiais para substituir osso e partes perdidas do corpo não seja recente, a utilização de materiais nano-estruturados em relação aos materiais convencionais é relativamente nova e recente por apresentarem melhores propriedades superficiais (quando comparados aos convencionais)^{7,8,10}. Nanomateriais apresentam um aumento do número de átomos, partículas ou porosidades nas superfícies, uma maior área de superfície e uma alteração na distribuição de elétrons se comparados aos materiais convencionais, fazendo com que fiquem mais reativos que os materiais convencionais.

Vários autores tem demonstrado a importância da Nanotecnologia no desenvolvimento de novos materiais, com especial ênfase no processo de osseointegração e regeneração óssea^{3,4,7-9,11}. Do ponto de vista do processo de osseointegração, foi observado um aumento da adesão de células ósseas em materiais nano-estruturados, é também seguido por uma diminuição da afinidade de fibroblastos pela superfície destes materiais⁸, com uma redução da afinidade de fibroblastos de 3 para 1 quando comparado com osteoblastos na superfície de alumina. Na superfície convencional a relação entre osteoblastos e fibroblastos foi de 1 para 1.

As superfícies atuais dos implantes osseointegrados, em sua grande maioria, são superfícies moderadamente rugosas¹², preparadas e/ou modificadas com materiais produzidos em escala micrométrica ou sub-micrométrica (menores do que 1µm, mas acima de 100nm), e em muitos casos têm também um tratamento químico da superfície que altera suas propriedades melhorando a adesão celular^{13,14}.

Baseado no fato de que as superfícies nanoestruturadas podem modular a resposta celular, o objetivo deste trabalho foi estudar “*in vitro*” e “*in vivo*” a expressão diferencial de genes da cascata de diferenciação de osteoblastos em função de distintos materiais e superfícies em implantes osseointegrados, com possível redução do período de osseointegração em função da interação célula-implante, baseado na hipótese de que a expressão gênica é controlada em níveis locais na superfície de implantes osseointegrados, para poder explicar os diferentes perfis histológicos de formação óssea e torque de remoção nas diferentes superfícies de implantes.

MATERIAL E MÉTODO

1. Análise da topografia e composição química da superfície dos implantes

Foram utilizados discos (6,0x1,0mm) de Titânio (Ti) comercialmente puro Grau IV de diferentes superfícies (NEODENT Implantes Osteointegráveis, Curitiba, PR, Brasil): Ti usinado (L);

Tabela 1. Tratamentos de superfície utilizados.

Grupo	Tratamento de superfície
L	Implante usinado (superfície lisa)
Ac	Ataque ácido
A	Óxido de Titânio (forma cristalina Anatase)
R	Óxido de Titânio (forma cristalina Rutilio)
Al	Óxido de Alumínio
Zr	Óxido de Zircônia

Ti com ataque ácido (Ac); Ti revestido com óxido de titânio-forma cristalina anatase (A); Ti revestido com óxido de titânio-forma cristalina rutilo (R); Ti revestido com óxido de alumínio (Al); Ti revestido com óxido de zircônia (Zr). A topografia de superfície dos implantes e discos de titânio submetidos aos diferentes tratamentos de superfície foi avaliada utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de alta resolução (*Field Emission Scanning Electron Microscope* (FEG-SEM), Hitachi S-4700, Tóquio, Japão) com imagens em aumento de até 100.000X.

A rugosidade da superfície foi avaliada utilizando Microscópio de Força Atômica (MFA) (*Nanoscope IIIA atomic force microscope* - Digital Instruments, Santa Barbara, CA, EUA). A composição química das superfícies foi avaliada através de EDS acoplado ao Microscópio Eletrônico de Varredura - *Oxford INCA X-sight microanalysis system* (Oxford Instruments, Reino Unido).

Os implantes utilizados neste estudo foram do tipo parafuso em Tícp (NEODENT Implantes Osteointegráveis, Curitiba, PR, Brasil) com as superfícies preparadas conforme explicado acima. O comprimento foi de 4,00mm e o diâmetro de 1,6mm. As superfícies foram divididas em 6 (seis) grupos, de acordo com o tratamento de superfície realizado (Tabela 1). Os grupos L e Ac serão os grupos controle dos tratamentos de superfície.

2. Avaliação da biocompatibilidade “*in vivo*”

2.1. Animais utilizados e Cirurgia para instalação dos implantes

Os animais experimentais utilizados foram *Ratus norvegicus* de linhagens controladas (ratos Wistar)¹⁵. Estes ratos pesavam aproximadamente 300 gramas (12 semanas de vida) ao serem utilizados. A anestesia geral foi induzida com injeção intramuscular de *Dopalen* (Cloridrato de Quetamina) e *Anasedan* (Cloridrato de Xilazina) na dosagem de 0,1ml/100g de massa corporal. Após a cirurgia os animais receberam medicação analgésica com *Carprofeno* na dose de 5mg/kg subcutâneo a cada 12h durante 72h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas.

Foram instalados um ou dois implantes (4,0mmX1,6mm) de cada superfície em cada tibia dos animais. As perfurações para instalação destes implantes foram realizadas com um motor cirúrgico para colocação de implantes a uma velocidade de 800 rpm, sob irrigação constante com solução salina. Três animais distintos receberam os implantes de cada superfície de manei-

ra que nenhum animal tenha dois tipos de implantes iguais em patas diferentes. Os animais foram então sacrificados para os diferentes períodos de avaliação (3, 7, 14, 21 e 56 dias). Os animais foram sacrificados com doses excessivas de vapor etílico, conforme o protocolo aprovado.

2.2. Análise do torque de remoção

Após os diferentes períodos de avaliação (14, 21 e 56 dias) os animais foram sacrificados e a resistência à remoção do implantes do tecido ósseo (Torque de remoção) foi avaliada. O torque de remoção dos implantes foi avaliado através de um torquímetro digital (1200ATG-NS; Tochnichi, Tokyo, Japan). Foram utilizados seis implantes de cada grupo para cada período de avaliação diferente.

2.3. Avaliação da expressão gênica através de Real time PCR de transcritos selecionados

Após a remoção dos implantes, o osso ao redor destes implantes foi removido com broca trefina de 3,3mm de diâmetro para isolamento de RNA (ácido ribonucleico) com solução *Trizol* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A qualidade e quantidade do RNA foi avaliada com espectrofotômetro (260 e 280 nm) e foi utilizado 1 µg do RNA total para a obtenção do cDNA (ácido desoxiribonucleico complementar) (Superscript II, Invitrogen). Os genes selecionados para análise da expressão gênica foram: *Runx2*, Fosfatase alcalina (*alp*) e Sialo proteína óssea (*bsp*) utilizando primers da *Applied Biosystems* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) para PCR em tempo real (Real time PCR). As reações foram preparadas utilizando o kit *TaqMan Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) de acordo com o protocolo do fabricante em um termociclador ABI 7000 para Real time PCR (*Applied Biosystems*). A expressão relativa do mRNA foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e expressa como nível relativo de expressão. Estes genes foram analisados em períodos diferentes (3, 7 e 14 dias). Como controle interno foi utilizado o gene *GAPDH* (gene endógeno constitutivo).

2.4. Análise histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica, foi instalado um implante em cada tibia dos animais. Três animais distintos receberam os implantes de cada superfície de maneira que nenhum animal tenha dois tipos de implantes iguais em patas diferentes para os diferentes períodos de avaliação (21 e 56 dias). Os animais foram então sacrificados para os diferentes períodos de avaliação, as tibias foram removidas e fixadas em formol 4% por dez dias e então transferidas para uma solução de etanol 70%. As amostras foram então desidratadas em solução de etanol até a concentração 100% e embutidas em resina (*London Resin Company*, Berkshire, England) para preparo de amostras mineralizadas¹⁶.

Foram obtidas cortes histológicos de aproximadamente 50µm de espessura e corados com azul de toluidina para análise em microscópio ótico acoplado com uma câmera digital (*Sony Corp.*, Tóquio, Japão). As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software *Bioquant Nova* (*Bioquant Image Analysis Corporation*, Nashville, TN, EUA). A percentagem da área de contato entre

o osso e o implante foi então obtida em relação à área total do implante no tecido ósseo.

2.5. Análise por espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado - ICP-OES

Nos animais que receberam implantes por até 56 dias, amostras de diversos órgãos internos foram obtidas para avaliar a concentração de metal determinada por espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Foram obtidas amostras de fígado, pulmão, coração e rim dos animais que receberam implantes e também de animais pareados que não receberam implantes.

As amostras para cada animal foram congeladas, trituradas e liofilizadas. Em seguida estas amostras foram misturadas com 2ml de HNO₃ e água destilada em um total de 100ml e posteriormente filtradas. Foram então realizadas análises de Alumínio, Titânio e Zircônia para estas amostras utilizando uma amostra padrão como controle¹⁷.

3. Análise estatística

A estatística descritiva foi calculada utilizando o software SPSS (SPSS, Chicago, IL, EUA). Os parâmetros de rugosidade (Sa) foram comparados pela Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. As comparações dos valores de Torque de remoção e histomorfometria foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Para todos os testes estatísticos foi estabelecido um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Caracterização da superfície dos implantes

A análise da topografia através do MEV demonstrou a presença de nano-estruturas nas superfícies preparadas com o nano-coating. Tais nano-estruturas não foram observadas na superfície usinada ou na superfície com ataque ácido (Figs. 1-5). O MFA demonstrou que a rugosidade das superfícies nano-estruturadas foi similar aos valores da superfície Usinada (Fig. 6). A análise da composição química das superfícies dos implantes através do EDS demonstrou que as superfícies apresentam a composição química esperada (Fig. 7). Foi observado a presença de Alumínio ou Zircônia nas respectivas superfícies (além de Oxigênio).

Avaliação da expressão gênica

O padrão de expressão dos genes avaliados está apresentado como mudanças relativas no nível de expressão comparados à superfície usinada 3 dias. Para a superfície recoberta com óxido de Alumínio (Al), a expressão relativa do gene *Runx2*, após 3 dias, apresentou uma indução 3x maior que o grupo controle (usinado), enquanto as demais superfícies não apresentaram variações nesse período (Figura 8). Após 7 dias, o nível de expressão do gene *Runx2* apresentou pequena variação entre as superfícies estudadas. Após 14 dias, as superfícies Al e Zr apresentaram ainda um aumento de 2,7x e 3,2x, respectivamente, comparado ao controle (usinado) (Figura 8).

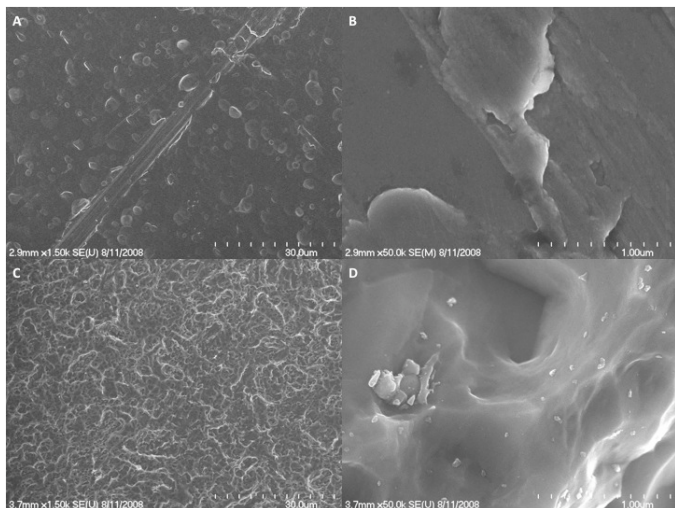


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura das superfícies controle. Imagens da superfície Usinada em A) baixo aumento (5.000x) e B) grande aumento (50.000x). Imagens da superfície com Ataque ácido em C) baixo aumento (5.000x) e D) grande aumento (50.000x).

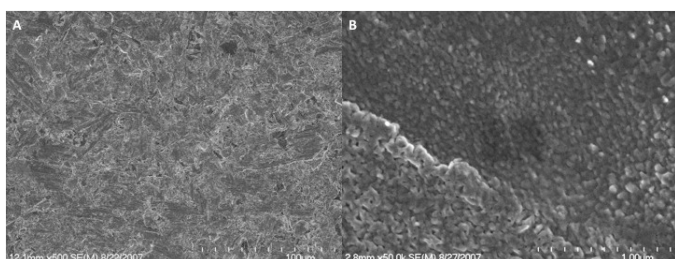


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura da superfície recoberta com óxido de titânio – Anatase em A) baixo aumento (5.000x) e B) grande aumento (50.000x). É possível observar a presença de nano-estruturas recobrendo completamente a superfície (B).

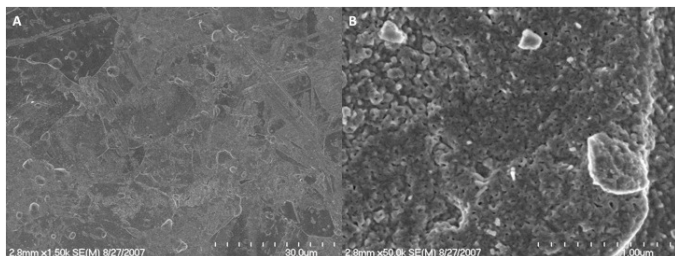


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura da superfície recoberta com óxido de titânio - Rutile em A) baixo aumento (5.000x) e B) grande aumento (50.000x). É possível observar a presença de nano-estruturas recobrendo completamente a superfície (B).

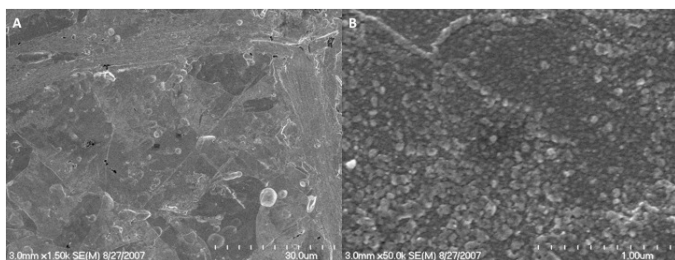


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura da superfície recoberta com óxido de alumínio em A) baixo aumento (5.000x) e B) grande aumento (50.000x). É possível observar a presença de nano-estruturas recobrendo completamente a superfície (B).

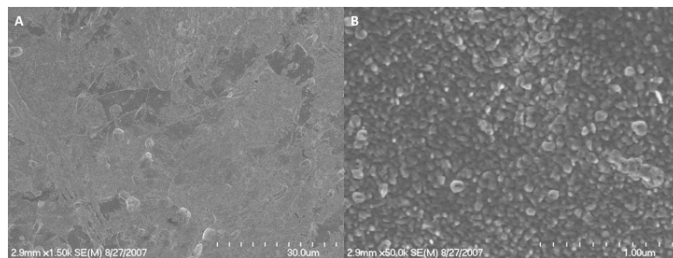
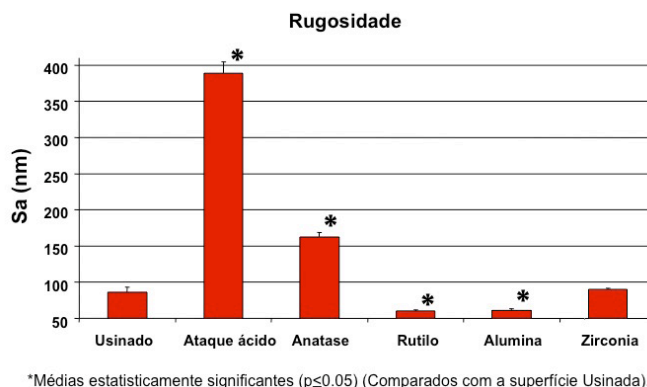


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura da superfície recoberta com óxido de zircônio em A) baixo aumento (5.000x) e B) grande aumento (50.000x). É possível observar a presença de nano-estruturas recobrendo completamente a superfície (B).



*Médias estatisticamente significantes ($p < 0.05$) (Comparados com a superfície Usinada).

Figura 6. Medida da rugosidade das superfícies avaliadas (S_a em nm).

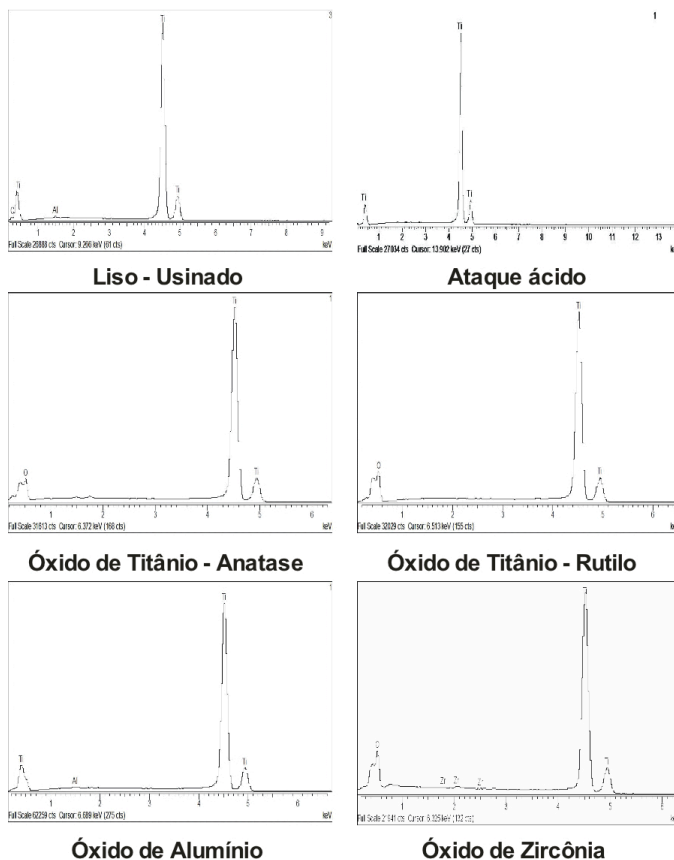


Figura 7. Micro-análise de raios X (EDS) demonstrando a composição química das superfícies.

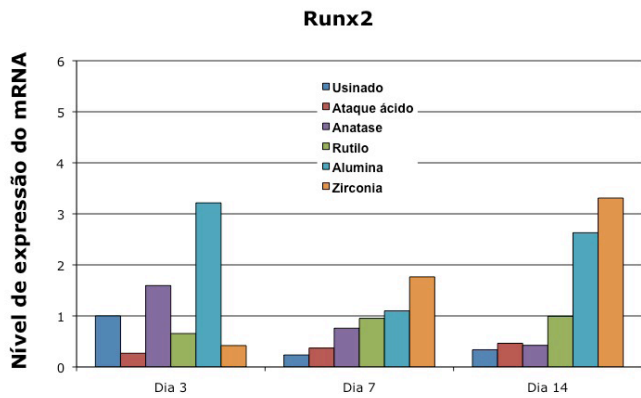


Figura 8. Nível de expressão relativo do gene *Runx2* no tecido ósseo ao redor do implantes. Os resultados apresentados são comparado à superfície usinada dia 3. Os resultados são apresentados como nível de expressão relativo ao grupo controle - Usinado Dia 3 (Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$).

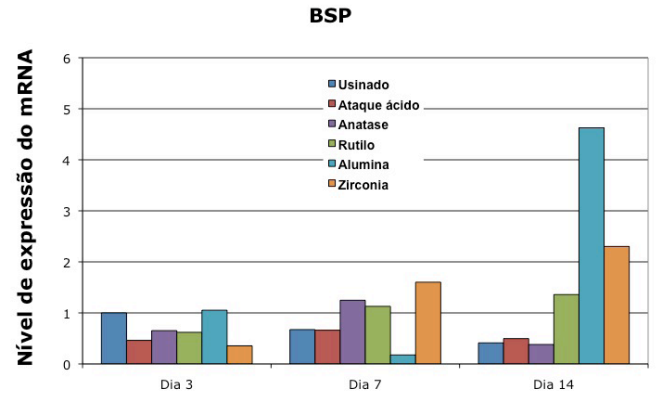


Figura 10. Nível de expressão relativo do gene *bsp* (Sialoproteína óssea) no tecido ósseo ao redor do implantes. Os resultados apresentados são comparado à superfície usinada dia 3. Os resultados são apresentados como nível de expressão relativo ao grupo controle - Usinado Dia 3 (Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$).

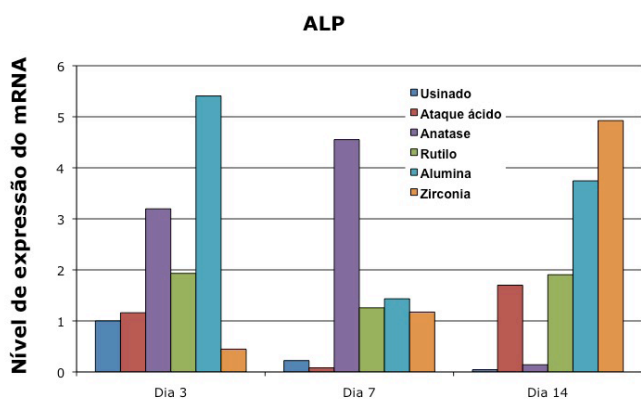


Figura 9. Nível de expressão relativo do gene *alp* (Fosfatase alcalina) no tecido ósseo ao redor do implantes. Os resultados apresentados são comparado à superfície usinada dia 3. Os resultados são apresentados como nível de expressão relativo ao grupo controle - Usinado Dia 3 (Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Os níveis de expressão do gene *alp* (fosfatase alcalina), medidos pela produção de seu mRNA apresentou-se bastante elevado para o grupo Alumina com um nível de expressão 5,2x maior após 3 dias e 3,8x após 14 dias, comparados com a superfície usinada (Figura 9). A superfície Anatase apresentou valores elevados com 3 e 7 dias, 3,2x e 4,6x respectivamente. A superfície Rutilo apresentou um aumento próximo de 2x após 3 e 14 dias. A superfície Zircônia obteve valores próximos de 5x apenas com 14 dias após a instalação dos implantes. A superfície com ataque ácido também apresentou diferenças nos níveis de expressão deste gene, quando comparados à superfície usinada com 14 dias (Figura 9).

Os níveis relativos de expressão do mRNA do gene *bsp* (sialoproteína óssea) após 3 e 7 dias são baixos, pois as células ainda não estão produzindo matriz mineralizada. Entretanto, após 14 dias os níveis de expressão apresentaram uma indução de 4,7x e 2,2x para as superfícies de Alumina e Zircônia, respectivamente, comparados com a superfície usinada (Figura 10). A superfície com ataque ácido não apresentou diferenças nos níveis de expressão deste gene, quando comparados à superfície usinada (Figura 10).

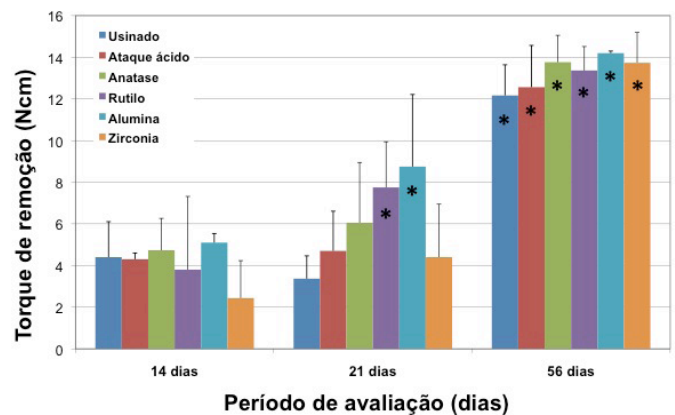


Figura 11. Torque de remoção dos implantes removidos da tibia dos animais. *Médias estatisticamente significantes ($p < 0.05$) (Comparados com a superfície Usinada 14 dias).

Análise do torque de remoção

Durante o período de avaliação as médias dos torques de remoção variaram de acordo com os dias avaliados (14<21<56) (Fig. 11). Após 21 dias, as superfícies nano-estruturadas de Rutilo e Alumina apresentaram estatisticamente um maior torque de remoção quando comparadas as superfícies Usinadas. As superfícies Anatase e Ataque ácido também tiveram um aumento no torque de remoção, mas este não foi estatisticamente significativo. Após 56 dias, todas as superfícies nano-estruturadas tiveram um maior valor de torque de remoção quando comparadas às superfícies controle. Estes resultados demonstram uma melhora da osseointegração no decorrer dos dias. E também quando se recobriu as superfícies de implantes lisos com o material nano-estruturado este aumento foi significativamente elevado em um período de tempo reduzido.

Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica demonstrou um maior contato entre osso e implante nas superfícies de implantes recobertas com materiais nano-estruturados. Após 56 dias todas as superfícies nano-estruturadas apresentaram mais de 50% de contato osso-implante, a superfície com Ataque ácido apresentou aproximadamente 40%. Já a superfície Usinada apresentou aproximadamente 30% de contato osso-implante (Fig. 12).

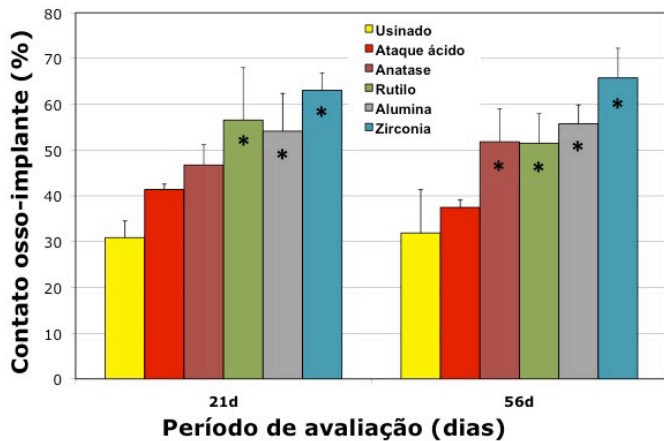


Figura 12. Contato osso-implante entre as diversas superfícies dos implantes e o tecido ósseo. *Médias estatisticamente significantes ($p \leq 0.05$) (Comparados com a superfície Usinada 21 dias).

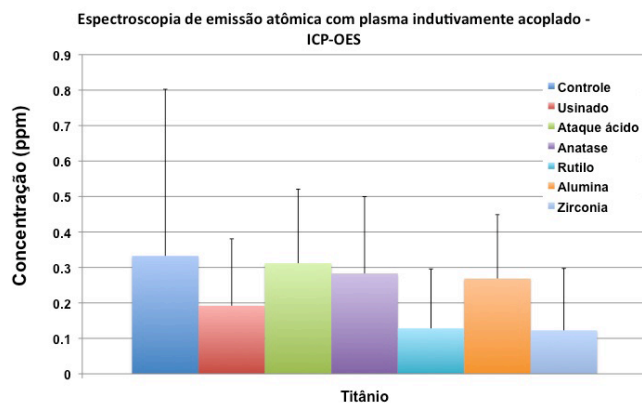


Figura 13 – Concentrações de Titânio nas amostras obtidas dos animais.

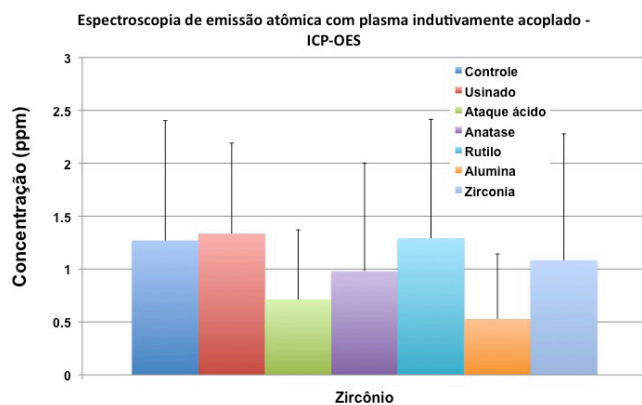


Figura 14. Concentrações de Zircônio nas amostras obtidas dos animais.

As superfícies de Alumina e Zircônia apresentaram os melhores resultados após 56 dias. As superfícies revestidas com material nano-estruturado mostraram-se superiores às superfícies convencionais, podendo ser uma solução efetiva em casos de osso tipo IV. O modelo animal dificultou a observação de diferenças estatisticamente significante entre os grupos apesar de terem sido observadas diferenças entre estes.

Análise por espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado

Para avaliar a possível liberação de metais depositados nas diferentes superfícies dos implantes, as amostras biológicas foram avaliadas após 56 dias. Este método oferece uma alta sensibilidade com um Limite de detecção (LD) de 0.09 ppm para Al, Ti e Zr (Figs. 13 e 14). Os resultados obtidos demonstraram uma alta estabilidade química dos materiais utilizados neste experimento. Ti e Zr não foram encontrados em concentrações diferentes do que as observadas nas amostras do grupo controle (animais de mesma idade e sem implantes). Não foi observado traços de Al em nenhuma das amostras analisadas.

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de características nanométricas adicionadas à superfície de implantes dentários osseointegrados de titânio. Vários trabalhos têm demonstrado uma série de efeitos benéficos quando características nanométricas são adicionadas à superfície dos implantes^{5, 6, 14, 18-25}. Estes efeitos foram então investigados a nível molecular e biomecânico *in vivo*. Neste trabalho não foi verificada nenhuma complicação referente à utilização destes implantes em animais. As superfícies nano-estruturadas avaliadas neste estudo são superfícies contendo uma camada nano-estruturada de óxido de titânio (Forma cristalina Anatase ou Rutilo), óxido de alumínio ou óxido de zircônio. Foram utilizadas duas superfícies como controles, uma composta por implantes usinados (de superfície lisa) e uma composta por implantes de superfície com ataque ácido (superfície rugosa – a nível micrométrico). Estes tipos de superfícies usadas como controle são geralmente os modelos padrão de superfície utilizados^{13,14,26}. Os métodos para obtenção de superfícies nanoestruturadas variam amplamente na literatura²⁷. Neste trabalho foi utilizado um método baseado na tecnologia de filmes finos, no qual uma camada de espessura nanométrica é adicionada a superfície dos implantes ou discos de titânio^{28, 29}. Neste método, diferentes materiais podem ser utilizados e adicionados à superfície como uma maneira de otimizar a superfície para o contato com o tecido ósseo.

A análise no MEV revelou que as superfícies nano-estruturadas apresentavam características em escala nanométrica que não estavam presentes nas superfícies usinadas (superfície lisa) ou com ataque ácido (rugosa a nível micrométrico). Estas estruturas são compostas por porosidades e acréscimos na superfície em escala menor do que 100nm (geralmente em torno de 20 a 50nm) (Figs. 1 a 5). A análise no AFM também demonstrou que as superfícies nano-estruturadas apresentaram uma rugosidade próxima a da superfície usinada. A análise de EDS demonstrou claramente que as superfícies nano-estruturadas de óxido de titânio, óxido de alumínio e óxido de zircônio tiveram a sua composição química alterada (Fig. 7). Nas superfícies preparadas a partir de alumínio e zircônio, estes materiais foram encontrados recobrendo amplamente as respectivas superfícies (Fig. 7). Esta análise também comprovou que estes materiais estavam na sua forma oxidada, o que os torna mais estáveis no meio biológico e menos prováveis de liberar íons metálicos e sofrer corrosão³⁰. Para as duas superfícies contendo óxido de titânio, também foi

observado a presença de titânio na forma de óxido de titânio e não titânio metálico (reativo). Para as superfícies lisa e rugosa foi observado a presença de titânio tanto na forma de óxido (TiO_2) quanto na forma de íons metálicos (reativos quimicamente), uma vez que a camada de óxidos nessas superfícies se formam naturalmente e são de aproximadamente 2-6nm de espessura³⁰. A literatura cita amplamente os benefícios do titânio como sendo biocompatível baseado na presença da camada de óxidos presente na superfície dos implantes^{31, 32}.

Os efeitos benéficos das superfícies nano-estruturadas em relação a sua composição química e características nanométricas foram observados neste trabalho. Os implantes de titânio recobertos com um filme nanométrico composto por óxido de titânio, óxido de alumínio ou óxido de zircônio foram avaliados quanto aos efeitos celulares (a nível molecular) e aos efeitos biomecânicos (torque de remoção) e histológicos (análise histométrica). O modelo animal utilizado neste estudo foi escolhido por sua facilidade de manuseio e permitir a utilização de implantes de tamanho reduzido, o que facilitou o desenvolvimento desta pesquisa. No entanto, o uso de um animal de pequeno porte dificultou algumas análises mecânicas e histométricas, pois o tamanho reduzido do implante limitou estes valores^{21, 22}. Todavia, os resultados obtidos nos permitiram verificar uma tendência a favor de todas as superfícies nano-estruturadas avaliadas. A superfície com ataque ácido também apresentou valores superiores a superfície usinada em relação ao torque de remoção e contato osso-implante. Os valores do torque de remoção e histométricos, mesmo reduzidos, foram comparáveis a outros estudos encontrados na literatura³³.

O estudo da expressão dos genes relativos à diferenciação na via osteogênica (esta diferenciação foi comprovada via PCR) demonstrou uma maior tendência de osteogênese nos implantes com superfície nano-estruturada. Este modelo *in vivo* permitiu avaliar os efeitos das superfícies na diferenciação destas células na linhagem osteoblástica. Os dados *in vivo* de análise molecular e biomecânicos (torque de remoção e histologia), comparados a superfície lisa e com ataque ácido, sugerem que a utilização de superfícies nano-estruturadas influenciam uma maior diferenciação e expressão de genes específicos da cascata de diferenciação de osteoblastos. Esta tendência é evidenciada pelo aumento nos níveis de expressão dos genes *Runx2*, *alp* e *bsp* nas superfícies nano-estruturadas. Um aumento no nível de expressão do gene *Runx2* indica um aumento na diferenciação de osteoblastos^{34, 35}. Este aumento na expressão de *Runx2* pode ser uma resposta específica da topografia da superfície sobre as células aderidas. Outros estudos também apresentaram expressão aumentada de *Runx2* em superfícies com topografia ativada^{25, 36, 37}.

Interessantemente, neste trabalho, as superfícies nano-estruturadas não se comportaram de maneira igual, indicando também um papel importante do material utilizado para recobrir estes implantes. A superfície recoberta com Alumina de maneira geral apresentou os melhores resultados de torque de remoção e expressão inicial dos genes relacionados à diferenciação de osteoblastos. A superfície recoberta com Zircônia apresentou um maior contato osso-implante, mas uma resposta mais lenta na expressão gênica, que refletiu em valores mais baixos de tor-

que de remoção até 21 dias. As superfícies recobertas com óxido de titânio apresentaram valores menores de torque de remoção, contato osso-implante e expressão gênica quando comparados as superfícies com Alumina ou Zircônia, entretanto estes valores foram maiores do que a superfície controle (Usinada). De acordo com outros autores, a modificação da nano-estrutura da alumina também influenciou na adesão de células ósseas. Foi observado um aumento de duas vezes na adesão de osteoblastos apenas modificando a forma da estrutura de alumina de nanopartículas para nanofibras. Demonstrando que não somente o tamanho do material pode ser importante, mas também a forma que ele apresenta para uma melhor relação com as proteínas que irão permitir a adesão celular³⁴. Outros metais também demonstraram aumentar a adesão celular quando em sua nanofase. Webster e Ejiófor¹⁰ (2004) estudaram a adesão celular sobre metais como Titânio, Ti6Al4V e CoCrMo e observaram um aumento desta adesão nestes metais quando em nanofase ao serem comparados com as conformações convencionais. Oh *et al.*² (2005) observaram o crescimento de cristais de hidroxiapatita sobre uma superfície de nanotubos de óxido de titânio tratada quimicamente com NaOH. Os nanotubos de óxido de titânio foram feitos por anodização e depois tratados com NaOH, e após o tratamento da superfície foram imersos em um meio semelhante ao plasma sanguíneo. Houve então a nucleação e o crescimento de nanocristais de hidroxiapatita. Foi observado que a formação dos cristais de hidroxiapatita foi acelerada pela composição nano-estruturada do óxido de titânio. No entanto, grande parte destes trabalhos ainda estão em fase experimental, não existindo no mercado odontológico um grande número de implantes odontológicos osseointegrados que atualmente use esta tecnologia.

A presença de partículas de alumina e óxido de titânio na viabilidade e densidade celular de osteoblastos foi comparada por Gutwein e Webster¹ (2004). Os autores estudaram se o tamanho dessas partículas (nanopartículas ou convencionais) seria importante para a viabilidade das células em casos onde fragmentos da camada superficial se soltassem durante o uso ou pelo desgaste de próteses inseridas no tecido ósseo. Os autores concluíram que houve um melhor resultado das nanopartículas quando comparadas às partículas de tamanho convencional. Neste trabalho não foi observado qualquer diferença na presença de partículas de Titânio, Alumínio ou Zircônio nos animais utilizados, indicando que a liberação destes materiais nestes tipos de superfícies de implantes não seria um problema.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados deste trabalho foi possível avaliar inicialmente os efeitos de superfícies nano-estruturadas de implantes osseointegrados com relação às superfícies Usinadas e com Ataque ácido na diferenciação de osteoblastos. As superfícies foram caracterizadas física e quimicamente e foi possível observar a presença de características nanométricas presentes na superfície. As superfícies nano-estruturadas levaram a um aumento da expressão de genes relacionados à cascata de diferenciação de osteoblastos no modelo animal utilizado (*Rattus norvegicus*). As superfícies nanoestruturadas levaram a um maior contato osso-

implante e a um aumento no torque de remoção. A superfície com Ataque ácido também apresentou uma melhora em relação a superfície Usinada com relação ao contato osso-implante e ao torque de remoção. Não foram observadas diferenças na presença dos metais livre: Alumínio, Titânio e Zircônio nos animais que receberam implantes e nos animais do grupo controle. Entretanto, estudos de longo prazo também são necessários para verificar o real desempenho e benefício de novas superfícies de implantes osseointegrados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Neodent Implante Osteointegrável por sua contribuição a este trabalho através de bolsa de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Gutwein LG, Webster TJ. Increased viable osteoblast density in the presence of nanophase compared to conventional alumina and titania particles. *Biomaterials* 2004;25(18):4175-83.
- Oh SH, Finones RR, Daraio C, Chen LH, Jin S. Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials* 2005;26(24):4938-43.
- Price RL, Gutwein LG, Kaledin L, Tepper F, Webster TJ. Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography. *J Biomed Mater Res* 2003;67(4):1284-93.
- Price RL, Haberstroh KM, Webster TJ. Enhanced functions of osteoblasts on nanostructured surfaces of carbon and alumina. *Med Biol Eng Comput* 2003;41(3):372-5.
- 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.
- Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials* 2007;28(32):4748-55.
- Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials* 1999;20(13):1221-7.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2000;21(17):1803-10.
- Webster TJ, Schadler LS, Siegel RW, Bizios R. Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin. *Tissue Eng* 2001;7(3):291-301.
- Webster TJ, Ejiófor JU. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials* 2004;25(19):4731-9.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000;51(3):475-83.
- 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;17(5):536-43.
- Buser D, Brogini N, Wieland M, *et al.* Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004;83(7):529-33.
- Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(5):659-66.
- Abron A, Hopfensperger M, Thompson J, Cooper LF. Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *J Prosthet Dent* 2001;85(1):40-6.
- 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(4):318-26.
- Oudadesse H, Derrien AC, Mami M, Martin S, Cathelineau G, Yahia L. Aluminosilicates and biphasic HA-TCP composites: studies of properties for bony filling. *Biomed Mater* 2007;2(1):S59-64.
- Mendonça G, Mendonça DB, Simoes LG, *et al.* The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials* 2009;30(25):4053-62.
- Mendonça G, Mendonça DB, Simões LG, *et al.* Nanostructured alumina-coated implant surface: effect on osteoblast-related gene expression and bone-to-implant contact in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24(2):205-15.
- Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. The combination of micron and nanotopography by H(2)SO(4)/H(2)O(2) treatment and its effects on osteoblast-specific gene expression of hMSCs. *J Biomed Mater Res A* 2010;94(1):169-79.
- 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;87(2):299-307.
- 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;23(4):641-7.
- Meirelles L, Melin L, Peltola T, *et al.* Effect of hydroxyapatite and titania nanostructures on early in vivo bone response. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008;10(4):245-54.
- Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, *et al.* Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO2 grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials* 2006;27(6):926-36.
- Guo J, Padilla RJ, Ambrose W, De Kok IJ, Cooper LF. The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO2 grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2007;28(36):5418-25.
- Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 1983;50(3):399-410.
- Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials* 2008;29(28):3822-35.
- Ben-Nissan B, Choi AH. Sol-gel production of bioactive nanocoatings for medical applications. Part 1: an introduction. *Nanomedicine (Lond)* 2006;1(3):311-19.
- Choi AH, Ben-Nissan B. Sol-gel production of bioactive nanocoatings for medical applications. Part II: current research and development. *Nanomedicine (Lond)* 2007;2(1):51-61.
- Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J Prosthet Dent* 1983;49(6):832-37.
- Linder L, Albrektsson T, Branemark PI, *et al.* Electron microscopic analysis of the bone-titanium interface. *Acta Orthop Scand* 1983;54(1):45-52.
- Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23(7):844-54.
- Narai S, Nagahata S. Effects of alendronate on the removal torque of implants in rats with induced osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18(2):218-23.
- Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003;423(6937):349-55.
- Cooper LF, Yliheikkilä PK, Felton DA, Whitson SW. Spatiotemporal assessment of fetal bovine osteoblast culture differentiation indicates a role for BSP in promoting differentiation. *J Bone Miner Res* 1998;13(4):620-32.

36. Isa ZM, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford CM. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21(2):203-11.

37. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, *et al.* The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater* 2007;6(12):997-1003.

ABSTRACT

Current trends in clinical dental implant therapy include use of endosseous dental implant surfaces embellished with nanoscale topographies. Nanotechnology deals with materials with at least one significant dimension less than 100nm. The goal of this study was to consider the role of nanoscale topographic modification of titanium substrates for the purpose of improving osseointegration. Nanotechnology offers engineers and biologists new ways of interacting with relevant biological processes. Moreover, nanotechnology has provided means of understanding and achieving cell specific functions. The various techniques that can impart nanoscale topographic features to titanium endosseous implants are described. Existing data supporting the role of nanotopography suggests that critical steps in osseointegration can be modulated by nanoscale modification of the implant surface. Important distinctions between nanoscale

and micron-scale modification of the implant surface are presently considered. The advantages and disadvantages of nanoscale modification of the dental implant surface are discussed. Finally, available data concerning the current dental implant surfaces that utilize nanotopography in clinical dentistry are described. Nanoscale modification of titanium endosseous implant surfaces can alter cellular and tissue responses that may benefit osseointegration and dental implant therapy. In a series of *in vitro* and *in vivo* experiments it was possible to evaluate the effect of these modifications in different study designs. The advantages of the use of nanocues added to the surface of the osseointegrated dental implants allowed to a better and faster osseointegration response of these materials, by acting on the differentiation of the osteoblasts.

KEYWORDS: Nanotopography, nanotechnology, dental implant, surface treatment, bone regeneration, cell signaling.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Gustavo MENDONÇA
University of North Carolina at Chapel Hill
School of Dentistry – Department of Prosthodontics
Manning Dr. & Columbia St.
CB #7450
Chapel Hill, NC 27599-7450
Phone / Fax: +1 (919) 966-2712
E-mail: gustavo_mendonca@dentistry.unc.edu