

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Departamento de CTBMF e Periodontia Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

FELIPE ANDERSON SOUSA NUNES

Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita

em escala nanométrica. Estudo in vivo em ratos expostos à fumaça do

cigarro, como um modelo ósseo deficiente.



Ribeirão Preto

2019

FELIPE ANDERSON SOUSA NUNES

Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica. Estudo *in vivo* em ratos expostos à fumaça do cigarro, como um modelo ósseo deficiente.

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Odontologia (Periodontia).

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza.

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação na publicação

Serviço de Biblioteca e Documentação

Nunes, Felipe Anderson Sousa

Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica. Estudo in vivo em ratos expostos à fumaça do cigarro, como um modelo ósseo deficiente / Felipe Anderson Sousa Nunes;

81 f.

Orientador: Sérgio Luís Scombatti de Souza.- 2019.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Programa de pós-graduação em odontologia (Periodontia), Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Nome: NUNES, Felipe Anderson Sousa

Título: Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica. Estudo in vivo em ratos expostos à fumaça do cigarro, como um modelo ósseo deficiente.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora	
rof. Dr	
nstituição:	
lgamento:	
rof Dr	
Ilgamento:	
rof. Dr	
nstituição:	
algamento:	

Dedicatória

Dedico esta tese à minha mãe, Claudenir Souza, pelo amor incondicional, por sempre acreditar e fazer o possível para que eu consiga alcançar os meus objetivos.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza**, por me guiar nos caminhos percorridos ao longo dos últimos anos; viabilizar a concretização de um sonho; pelo conhecimento transmitido; por contribuir na ampliação da minha visão científica e crítica sobre tudo que leio e faço; pelo apoio e pela amizade construída.

Aos docentes do programa de Pós-Graduação da FORP-USP: Prof. Dr. Michel Reis Messora, Prof. Dr. Mário Taba Júnior, Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto e Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior, pela imensa contribuição na minha formação acadêmica.

As técnicas de laboratório **Fabíola, Milla e Adriana,** pela contribuição essencial para o desenvolvimento e conclusão desta tese. Obrigado também pela paciência, e por tornar os dias no laboratório mais agradáveis.

A Edmara Tatiely pela colaboração na realização da análise estatística.

A **Paula Pêssoa, Uislen Cardore,** companheiros de pós-graduação e a **Ana Carolina Bachur** e **Graziella Paulino**, alunas da graduação, que dividiram comigo a função de colocar os ratos para inalar a fumaça de cigarro durante 60 dias seguidos, independente de ser manhã, tarde ou noite, de ser domingo ou feriado e que fizeram isso com uma responsabilidade imensa. Sou muito grato por toda a ajuda de vocês.

Aos meus demais contemporâneos de pós-graduação: Mariana Sales, Cristine Borges, Marcos Invernici, Kelly Rocio, Sérgio Lago, Gabriel Bastos, Luiz Fernando, Felipe Torres, Marília Reis, Kleber Toledo, Renata Cardoso e Átila Abreu pelo harmonioso convívio nos dias de clínica, pelo compartilhamento de conhecimento e toda colaboração ao longo da vida acadêmica.

Aos funcionários do biotério **Rafael, Aline, Sebastião** e **Marmita** pela assistência e gentilezas durante os 2 meses de experimento com os animais.

A **Daniela**, auxiliar da clínica de pós-graduação e demais funcionários da faculdade pelo auxílio nas atividades praticas e serviços administrativos.

A SIN implantes pela doação dos matérias necessários para a realização dessa pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático representando o mecanismo de exposição à fumaça.

Figura 2. Imagem representativa do implante utilizado.

Figura 3. Instalação do implante.

Figura 4. Esquema ilustrativo demonstrando as áreas consideradas para as medições de BIC (A) e BAFO (B).

Figura 5. Nível de cotinina plasmática, em nanogramas por mililitro, (média + IC 95%) nos diferentes tempos após a exposição dos ratos à fumaça do cigarro.

Figura 6. Reconstrução das imagens microtomográficas.

Figura 7. Gráficos representando a porcentagem de contato tridimensional osso-implante (% IS/TS) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média + IC 95%).

Figura 8. Gráfico representando a porcentagem de contato tridimensional osso-implante (IS/TS, %) quando todos os grupos foram analisados de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 9. Gráficos representando a porcentagem de volume ósseo pelo volume total de tecido (BV/TV, %) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 10. Gráfico representando a porcentagem de volume ósseo pelo volume total (BV/TV, %) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 11. Gráficos representando a porcentagem de porosidade total (Po.To, %) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 12. Gráfico representando a porcentagem de porosidade total (Po.To, %) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 13. Gráficos representando a separação trabecular (Tb.Sp, mm) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 14. Gráfico representando a separação trabecular (Tb.Sp, mm) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 15. Imagens histológicas coradas com Stevenel's blue e Vermelho de Alizarina de todos os grupos experimentais.

Figura 16. Gráficos representando a porcentagem de contato osso-implante (BIC, %) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 17. Gráfico representando a porcentagem de BIC quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 18. Gráficos representando a densidade óssea entre os ápices de rosca do implante (BAFO, %) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 19. Gráfico representando a densidade óssea entre os ápices de rosca do implante (BAFO, %) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 20. Gráficos representando a expressão relativa de Fosfatase Alcalina/GAPDH (Alp/GAPDH) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 21. Gráfico representando a expressão relativa de Fosfatase Alcalina/GAPDH (ALP/GAPDH) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 22. Gráficos representando a expressão relativa de Osteopontina/GAPDH (OPN/GAPDH) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 23. Gráfico representando a expressão relativa de Osteopontina/GAPDH (OPN/GAPDH) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 24. Gráficos representando a expressão relativa do receptor ativador de fator nuclear Kappa ligante (RANKL) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 25. Gráfico representando a expressão relativa do receptor ativador de fator nuclear Kappa ligante (RANKL) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 26. Gráficos representando a expressão relativa de osteoprotegerina/GAPDH (OPG/GAPDH) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 27. Gráfico representando a expressão relativa de osteoprotegerina/GAPDH (OPG/GAPDH) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 28. Gráficos representando a expressão relativa de (RANKL/OPG)/GAPDH ((RANKL/OPG)/GAPDH) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 29. Gráfico representando a expressão relativa de (RANKL/OPG)/GAPDH ((RANKL/OPG)/GAPDH) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 30. Gráficos representando a expressão relativa de Osteocalcina/GAPDH (OC/GAPDH) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 31. Gráfico representando a expressão relativa de Osteocalcina/GAPDH (OC/GAPDH) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

Figura 32. Gráficos representando a expressão relativa de Fator de transcrição "runt related" 2/GAPDH (RUNX2/GAPDH) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%).

Figura 33. Gráfico representando a expressão relativa de Fator de transcrição "runt related" 2/GAPDH (RUNX2/GAPDH) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mm: milimetro
BSP: sialoproteína óssea
OPN: osteopontina
HA: hidroxiapatita
NanoHA: nanohidroxiapatita
Micro-CT: microtomografia computadorizada
IS/TS: contato tridimensional osso-implante
Po.To: porosidade total
Tb.Sp: separação trabecular
BIC: contato osso-implante
BAFO: densidade óssea ao redor do implante
ALP: fosfatase alcalina
RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa-B
RANKL: receptor ativador do fator nuclear kappa ligante
OPG: osteoprotegerina
OC: osteocalcina
RUNX2: fator de transcrição "runt related" 2
S.I.N.: Sistema de Implante
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
USP: Universidade de São Paulo
FORP: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
mg: miligrama
cm ³ : centímetro cúbico
ml: mililitro
PVPI: Polivinil Pirrolidona Iodo

n°: número kg: kilograma PBS: tampão fosfato de sódio pH: potencial hidrogeniônico µm: micrometro RNA: ácido ribonucleico min: minuto g: grama h: hora nm: nanometro °C: grau Celsius DNA: ácido desoxirribunucleico cDNA; ácido desoxirribonucleico complementar Ct: cicle threshold ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática IC: intervalo de confiança DAA: duplo ataque ácido NANO: nanohidroxiapatita D: Dias

x: vezes

Sumário

RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	
2. OBJETIVO	24
3. MATERIAS E MÉTODOS	26
3.1. Comissão de ética	27
3.2. Cálculo amostral	
3.3. Caracterização da amostra	
3.4. Indução do tabagismo	
3.5. Registro dos níveis de cotinina	29
3.6. Instalação dos implantes	29
3.7. Divisão dos grupos experimentais	31
3.8. Análise microtomográfica	32
3.9. Preparo das peças para histomorfometria	
3.10. Análise da expressão gênica	
3.11. Análise estatística	
4. RESULTADOS	
4.1. Resultados microtomográficos	40
4.1.1. Contato tridimensional osso-implante (IS/TS)	40
4.1.2. Densidade óssea tridimensional (BV/TV)	42
4.1.3. Porcentagem da porosidade total (Po.To)	43

4.1.4. Separação trabecular (Tb.Sp)	45
4.2. Resultados histomorfométricos	46
4.2.1. Contato osso-implante (BIC)	47
4.2.2. Densidade óssea ao redor dos implantes (BAFO)	49
4.3. Resultados da expressão gênica	50
4.3.1. Fosfatase alcalina (ALP)	50
4.3.2. Osteopontina (OPN)	52
4.3.3. Receptor ativador do fator nuclear kappa ligante (RANKL)	53
4.3.4. Osteoprotegerina (OPG)	54
4.3.5. Relação RANKL/OPG	56
4.3.6. Osteocalcina (OC)	58
4.3.7. Fator de transcrição "runt related" 2 (RUNX2)	
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. ANEXO	80

Nunes, FAS. Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica. Estudo in vivo em ratos expostos à fumaça do cigarro, como um modelo ósseo deficiente. [Tese de doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2019.

Resumo

Substituir um dente em falta com implantes endósseos tem sido reconhecida como uma opção de tratamento bem sucedida a longo prazo. Todavia, alguns fatores podem contribuir para uma cicatrização deficiente e maior risco de perda dos implantes, dentre os quais está o hábito de fumar. Modificações relacionadas ao desenho do corpo do implante e as características topográficas e químicas da superfície tem sido desenvolvidas para se obter melhor performance e menor tempo de ósseointegração, em especial para situações desafiadoras, como o tratamento de pacientes fumantes. O objetivo desta pesquisa foi realizar um estudo in vivo, em ratos expostos à fumaça do cigarro, para avaliar uma nova superfície de implante modificada pela adição de nano-hidroxiapatita, por meio de análises histomorfométrica, microtomográfica e da avaliação da expressão gênica. Para sua realização, 36 ratos foram submetidos à inalação da fumaça de 10 cigarros, 3 vezes ao dia, durante 60 dias. No trigésimo dia do experimento foram instalados implantes com 2,7 mm de comprimento e 1,4 mm de diâmetro e diferentes tipos de superfície (lisa, duplo ataque ácido e cobertas com nano-hidroxiapatita), em ambas as tíbias, após a realização de um retalho de aproximadamente 1,5 cm e utilização de broca piloto. Durante todo o período em que permaneceram com os implantes os animais continuaram inalando fumaça de cigarro. Os ratos foram sacrificados 7 e 30 dias após a instalação dos implantes. As tíbias foram então removidas: as tíbias direitas foram selecionadas para a execução da microtomografia e análise histomorfométrica, enquanto que as tíbias esquerdas foram utilizadas para análise de expressão gênica. Durante o procedimento cirúrgico para instalação dos implantes ou remoção das tíbias, foi coletado 1 ml de sangue via punção venosa cardíaca, o qual foi utilizado para quantificação dos níveis plasmáticos de cotinina por meio de teste ELISA. Para a avaliação de parâmetros ósseos foram feitas análises tridimensionais, após cortes microtomográficos seriados, analisando: Contato tridimensional osso-implante (IS/TS), Densidade óssea tridimensional (BV/TV), Porcentagem de porosidade total (Po.To) e Separação trabecular (Tb.Sp). Na análise histomorfométrica, em cortes não calcificados, avaliou-se o contato osso-implante (BIC) e a densidade óssea da área entre as rocas do implante (BAFO). Quantificou-se ainda, por Real-Time PCR, a expressão gênica de:

Fosfatase alcalina (ALP), Osteopontina (OPN), Receptor ativador do fator nuclear kappa ligante (RANKL), Osteoprotegerina (OPG), Osteocalcina (OC) e Fator de transcrição runt releated (RUNX2). Os resultados obtidos demonstraram maior quantidade de cotinina plasmática à medida que aumentou o período de exposição à fumaça do cigarro. A superfície NANO apresentou resultados numéricos superiores em relação às superfícies DAA e LISA, nas análises microtomográficas (IS/TS: LISA 29,87 \pm 6,87, DAA 36,29 \pm 6,87, NANO 43,39 \pm 6,87; BV/TV: LISA 26,95 \pm 6,95, DAA 34,01 \pm 6,95, NANO 35,11 \pm 6,95) e histomorfométricas (BIC, resultados em função da superfície: LISA $42,35 \pm 6,98$, DAA 45,24± 6,98, NANO 49,10 ± 6,98; BAFO: LISA 50,45 ± 7,01, DAA 46,30 ± 6,98, NANO 53,73 ± 6,98), entretanto sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Na análise dos parâmetros relacionados à expressão gênica a superfície NANO mostrou-se superior em relação à DAA e LISA, com diferenças estatisticamente significantes, em especial no período de 30 dias (ALP, resultados em função da superfície: LISA 0,63 \pm 0,04, DAA 0,82 \pm 0,04, NANO 1,06 \pm 0,04; OPN: LISA 0,61 \pm 0,04, DAA 0,87 \pm 0,04, NANO 1,70 \pm 0,04; RANKL/OPG: LISA: 0,58 ± 0,04 DAA: 0,43 ± 0,04 NANO 0,25 ± 0,04; OC: LISA 0,98 ± 0,13, DAA 1,32 \pm 0,13, NANO 1,86 \pm 0,13; RUNX2: LISA 0,70 \pm 0,03, DAA 0,77 \pm 0,03, NANO 1.28 \pm 0.03). Concluiu-se que houve superioridade da superfície NANO em relação às superfícies DAA e LISA, em ratos submetidos à inalação da fumaça de cigarro, e um atraso no reparo ósseo nos animais expostos à fumaça do cigarro, que não foi totalmente compensado por nenhuma superfície até o período de tempo avaliado.

Palavras-chave: superfície de implante, nanohidroxiapatita, microtomografia, histomorfometria, expressão gênica, reparo ósseo.

Nunes, FAS. Evaluation of a new implant surface covered by hydroxyapatite at nanoscale. In vivo study in rats exposed to cigarette smoke as a poor bone model. [Doctoral thesis]. Ribeirão Preto: School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2019.

Abstract

Replacing a missing tooth with endosteal implants has been recognized as a successful long term treatment option. However, some factors may contibute to poor healing and increased risk of impant loss, including smoking. Modifications in the design of the implant and in the topographic and chemical characteristics of the surface have been developed to obtain better performance and shorter osseointegration time, especially for challenging clinical situations, such as the treatment of smoking patients. The aim of this research was to evaluate a new implant surface modified by the addition of nanohydroxyapatite, in an *in vivo* study in rats exposed to cigarette smoke, by means of histomorphometric, microtomographic and gene expression analysis. For that, 36 rats were submitted to the inhalation of the smoke of 10 cigarettes, 3 times by day, during 60 days. On the thirtieth day of the experiment, implants with 2.7mm in length and 1.4mm in diameter and different surface types (Smooth- SMO Group, double acid etched – DAE Group, and covered with nanohydroxyapatite – NANO Group) were installed in both tibia, after a flap of approximately 1.5 cm and use of pilot drill. The animals continued to inhale cigarette smoke throughout the time they stayed with the implants. The rats were sacrificed 7 and 30 days after implant installation (18 animals in each period, 6 from each group). The tibiae were then removed: right tibiae were selected for microtomography and histomorphometric analysis, while left tibias were used for gene expression analysis. During the surgical procedure to implant placement or tibia removal, 1 ml of blood was collected via heart venipuncture, and was used for cotinine plasma levels quantification by ELISA. Three-dimensional microtomographic analyzes evaluated Threedimensional bone-implant contact (IS/TS), Three-dimensional bone density (BV/TV), Percentage of total porosity (Po.To) and Trabecular separation (Tb.Sp). Histomorphometric analysis evaluated the bone-implant contact (BIC) and the bone area fraction occupancy (BAFO) in the area between implant threads. Gene expression of Alkaline phosphatase (ALP), Osteopontin (OPN), Activator Receptor of nuclear kappa binding factor (RANKL), Osteoprotegerin (OPG), Osteocalcin (OC) and Factor transcript runt releated (RUNX2) was also quantified by Real-Time PCR. The results showed that plasma cotinine concentration increased as the period of exposure to cigarette smoke increased. NANO surface presented higher numerical results than the DAE and SMO groups for microtomographic (IS/TS: SMO

29.87 ± 6.87, DAE 36.29 ± 6.87, NANO 43.39 ± 6.87; BV/TV: SMO 26.95 ± 6.95, DAE 34.01 ± 6.95, NANO 35.11 ± 6.95) and histomorphometric (BIC: SMO 42.35 ± 6.98, DAE 45.24 ± 6.98, NANO 49.10 ± 6.98; BAFO: SMO 50.45 ± 7.01, DAE 46.30 ± 6.98, NANO 53.73 ± 6.98) analyzes, meanwhile without statistically significant differences between the groups. Gene expression evaluation showed that the NANO surface was superior in relation to DAE and SMO, with statistically significant differences, especially in the period of 30 days (ALP: SMO 0.63 ± 0, 04, DAE 0.82 ± 0.04, NANO 1.06 ± 0.04, OPN: SMO 0.61 ± 0.04, DAE 0.87 ± 0.04, NANO 1.70 ± 0.04, RANKL/OPG: SMO: 0.58 ± 0.04 DAE: 0.43 ± 0.04 NANO 0.25 ± 0.04 OC: SMO 0.98 ± 0.13, DAE 1.32 ± 0.13, NANO 1.86 ± 0.13, RUNX2: SMO 0.70 ± 0.03, DAE 0.77 ± 0.03, NANO 1.28 ± 0.03). It was concluded that NANO surface presented superior results in relation to the DAE and SMO surfaces in rats subjected to inhalation of cigarette smoke, and that the animals exhibited a delay in bone healing in the animals, which was not fully compensated by any surface until the period of time evaluated.

Keywords: implant surface, nanohydroxyapatite, microtomography, histomorphometry, gene expression, bone healing.

1. Introdução

1 – Introdução

A reabilitação bucal com implantes dentários é uma modalidade de tratamento previsível para pacientes parcialmente ou completamente desdentados (Karoussis et al., 2003). Entretanto, a taxa de sucesso desta modalidade de tratamento pode ser influenciada por diversos fatores, tais como a osseointegração bem sucedida dos implantes dentários (Pjetursson et al., 2004), a relação entre a restauração final e os dentes adjacentes (Lang & Zitzmann, 2012), o carregamento oclusal (Chambrone et al., 2010), a saúde dos tecidos moles e duros (De la Rosa et al., 2013), a condição sistêmica, como por exemplo a presença de Diabetes Mellitus (Kotsovillis et al., 2006), e hábitos deletérios à saúde, como o tabagismo (Stietzel et al., 2007).

O hábito de fumar pode ser observado em um sexto da população mundial. A maioria dos estudos sobre a associação entre tabagismo e condições médicas relatam efeitos negativos em todo o corpo (Saito et al., 2013). Diversas são as substâncias presentes na fumaça do cigarro que podem apresentar potencial tóxico, como a acroleína e o acetaldeído, que inibem a proliferação e adesão de fibroblastos gengivais *in vitro* (Cattaneo et al., 2000), o monóxido de carbono, que diminui a oxigenação dos tecidos (Sherwin & Gastwirth, 1990) e o cianeto de hidrogênio, que inibe o metabolismo oxidativo e o transporte de oxigênio em nível celular (Mosely & Finseth, 1977). Não obstante, entre as mais de 4000 substâncias encontradas, a nicotina tem sido considerada a de maior importância para os efeitos adversos relacionados à saúde (Tonetti, 1998).

A nicotina promove uma diminuição do suprimento sanguíneo pela liberação de catecolaminas, que resultam em uma vasoconstrição e consequente diminuição da perfusão tecidual (Reus et al., 1984), a qual reduz a proliferação de hemoglobina, macrófagos e fibroblastos, importantes elementos da cicatrização (Sherwin & Gastwirth, 1990). A nicotina também reduz a atividade osteogênica, aumenta a perda óssea periodontal e peri-implantar e pode favorecer a perda de implantes dentários (Baig & Rajan, 2007).

Bain e Moy analisaram a relação entre a falha de implantes e o tabagismo, após o acompanhamento de 6 anos da instalação de 2194 implantes Brenemark, e observaram uma taxa de insucesso geral de 5,92%, valor similar ao encontrado em outros estudos. Todavia, quando os pacientes foram subdivididos em fumantes e não fumantes, nos quais foram instalados 390 e 1804 implantes respectivamente, verificou-se uma porcentagem significativamente maior de falhas ocorridas em fumantes (11,28%) do que em não-fumantes

(4,76%). Tais resultados levaram os autores a concluir que o tabagismo atua como um fator significante no aumento do índice de perdas de implantes dentários (Bain & Moy, 1993).

Haas et al., estudaram a relação entre o consumo de cigarros e os tecidos periimplantares. Participaram da pesquisa 107 fumantes (366 implantes) e 314 não fumantes (1000 implantes), que foram avaliados clínica e radiograficamente. Não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto ao nível de higiene oral, além de não terem sido observadas diferenças em nenhum dos parâmetros avaliados nos implantes colocados na arcada inferior. Entretanto, os pacientes fumantes mostraram valores maiores para o índice de sangramento (fumantes: 1,65 e não-fumantes: 0,85), profundidade de sondagem peri-implantar (fumantes: 4,32mm e não-fumantes: 2,78mm) e perda óssea detectada radiograficamente (fumantes: 4,0mm e não-fumantes 1,53mm) para a região da maxila. Os autores concluíram que os pacientes fumantes possuem maior risco para o desenvolvimento de peri-implantite (Haas et al., 1996).

Nociti Jr. et al., avaliaram a influência da exposição intermitente à fumaça do cigarro sobre o volume ósseo ao redor de implantes de titânio em ratos. Para a realização do estudo foram utilizados 32 ratos machos da espécie Wistar, divididos em 2 grupos: teste (exposição à fumaça de 10 cigarros, 3 vezes ao dia, durante o período de 60 dias de reparo ósseo) e controle (sem exposição à fumaça). Após análise histomorfométrica, os autores verificaram uma redução da densidade óssea na região lateral ao implante e prejuízo no reparo ósseo no grupo exposto à fumaça do cigarro. Tal fato foi mais evidenciado na região medular do grupo teste, onde a área de osso dentro das roscas e o contato osso/implante foram menores (Nociti Jr. et al., 2002, Nociti Junior et al., 2002).

Cyprus et al., analisaram marcadores pró-inflamatórios e a diferenciação osteogênica em discos de titânio com diferentes rugosidades e fêmures de camundongos expostos a um extrato de fumaça de cigarro administrado via intraperitoneal, e concluíram que o extrato da fumaça do cigarro foi capaz de promover uma maior concentração de citocinas circulantes quando comparado ao grupo controle, além de um fenótipo osteoporótico no osso trabecular femural dos ratos expostos ao extrato da fumaça (Cyprus et al., 2018).

Apesar das altas taxas de sucesso no tratamento com implantes, modificações relacionadas ao desenho do corpo do implante e às características topográficas e químicas da superfície tem sido desenvolvidas para se obter melhor performance e menor tempo de osseointegração, em especial para situações desafiadoras (Misch et al., 2004), como o

tratamento de pacientes fumantes. Alterações da topografia da superfície podem ser realizadas através de vários métodos, como a utilização de ataques ácidos, jateamento de partículas e adição de elementos químicos à superfície dos implantes (Le Guehennec et al., 2007). Em um estudo envolvendo o jateamento de partículas associado a diferentes tipos de condicionamento ácido, Buser et al. demonstraram que superfícies moderadamente ásperas apresentaram melhor resposta óssea quando comparadas a superfícies de implantes maquinadas e polidas (Buser et al., 1999).

Braceras et al. afirmaram que uma superfície rugosa facilita a retenção de células osteogênicas e a sua migração pela superfície do implante por meio da osseocondução (Braceras et al., 2009). Além disso, a presença de rugosidade na superfície do implante promove uma melhor aderência do colágeno e aumenta a área da superfície, resultando em mais sítios para a fixação das células, maior crescimento tecidual e estabilidade mecânica (Wennerberg & Albrektsson, 2009; Wennerberg & Albrektsson 2010).

As rugosidades presentes na topografia dos implantes podem variar de milímetros a nanometros. A influência de nanoestruturas na osseointegração ganhou muito interesse nos últimos anos, e vários estudos mostraram que importantes etapas do processo de osseointegração são moduladas pela presença de nanoestruturas (Mendonça et al., 2008; Mendonça et al., 2009). Esta superfície poderá ser de grande importância para a fixação de proteínas, durante os estágios iniciais da cicatrização óssea, de modo a favorecer principalmente os casos de carga imediata (Svanborg et al., 2010).

Entre as proteínas que se encontram envolvidas no processo de remodelação óssea que ocorre após a instalação dos implantes, podemos citar: Fator de transcrição "runt related" 2 (RUNX2), Fosfatase Alcalina (ALP), Osteocalcina (OC), Osteopontina (OPN), Osteoprotegerina (OPG), Receptor ativador do fator nuclear Kappa-B (RANK), e Receptor ativador do fator nuclear Kappa ligante (RANK-L). RUNX2 é o principal fator de transcrição que inicia a formação óssea (Lian et al., 2006) e a diferenciação de osteoblastos (Komori & Kishimoto, 1998). A Fosfatase Alcalina é uma glicoproteína produzida por osteoblastos que atua como um marcador na fase inicial da diferenciação, sendo necessária para a formação osteóide e mineralização da matriz (Harris, 1990; DeLaurier et al., 2002; Nune, 2018). A Osteocalcina é uma proteína de matriz extracelular não colagênica, secretada por osteoblastos, com alta afinidade ao cálcio essencial para a morfogênese esquelética e formação óssea (Cyprus et al., 2018). A Osteopontina é uma proteína da matriz extracelular não colagenosa

envolvida na formação óssea e calcificação que interage com as integrinas da superfície celular para regular a adesão, migração e proliferação celular. (Okamoto et al., 2007; Heinegard et al., 1989; Scatena et al., 2007). O sistema OPG/RANKL/RANK desempenha um papel central na regulação parácrina e na função dos osteoclastos (Blair et al., 2006). A OPG liga-se ao RANKL, ambos secretados pelos osteoblastos, e impossibilita a ligação do RANKL ao RANK, encontrado na membrana dos osteoclastos, o que inibe a reabsorção óssea (Khosla, 2001).

De Oliveira e Nanci avaliaram discos de titânio em um meio de cultura de células osteogênicas e descobriram que a nanotexturização das superfícies regulou positivamente a expressão de proteínas relacionadas com os primeiros eventos da mineralização óssea e regulação da deposição mineral (De Oliveira & Nanci, 2004). Em outro estudo utilizando meio de cultura, De Oliveira *et al.*, mostraram também um aumento da osteogênese em discos de titânio com uma nanotopografia produzida quimicamente (De Oliveira et al., 2007).

Jimbo *et al.*, em um estudo realizado em tíbias de coelhos, compararam implantes usinados a implantes revestidos com hidroxiapatita em escala nanométrica (nanoHA) e demonstraram que as superfícies nanoHA melhoraram significativamente a expressão do gene osteogênico, bem como apresentaram atividade osteoclástica elevada, indicando um potencial aumentado para remodelação óssea em torno deste tipo de superfície (Jimbo et al., 2011). Resultados favoráveis à superfície nanoHA também foram obtidos previamente por Meirelles *et al.*, que observaram um aumento precoce da formação óssea em implantes modificados com nano-hidroxiapatita quando comparado a implantes usinados instalados em tíbias de coelhos (Meirelles et al., 2008).

Bryington *et al.*, realizaram um estudo *in vivo* para análise biológica molecular em humanos, demonstrando que a topografia da superfície do implante influencia a expressão de genes específicos do osso e genes ligados à sinalização célula-célula durante as fases iniciais da osseointegração. Após 7 dias da instalação dos implantes, os marcadores osteoblásticos foram regulados positivamente na superfície nanotexturizada quando comparada à superfície com rugosidade em escala micrométrica (Bryington et al., 2014). Bai et al., ao realizar um estudo *in vitro* e *in vivo* utilizando coelhos, destacaram que a presença de partículas de hidroxiapatita em escala nanométrica sobre superfícies de implantes de titânio foi capaz de modular a resposta inflamatória, resultando em um ambiente mais favorável para a osteo/angiogênese (Bai et al., 2018).

Além da expressão gênica que quantifica as proteínas por meio de uma reação em cadeia de polimerase, outras técnicas tem sido usadas para avaliar a osseointegração em modelos *in vivo*, como radiografias, testes mecânicos, histológicos e/ou histomorfométricos (Johansson et al., 2012). A análise histomorfométrica bidimensional tem sido amplamente utilizada para examinar espécimes finas, devido à sua alta resolução espacial e contraste, que permitem avaliar o contato osso-implante e a área óssea (Le Guehennec et al., 2008). Entretanto, a utilização desta técnica possui um processo de fabricação destrutivo, que torna difícil reproduzir o espécime e limita a análise a uma área específica. Assim, surgiu a microtomografia computadorizada (micro-CT), possibilitando uma análise tridimensional que atua de forma complementar à análise bidimensional, para avaliação da morfologia e micro-estrutura óssea, utilizando dados de projeções de raios-X em vários ângulos para reconstruir uma representação em 3D do modelo que caracteriza a distribuição da densidade do material, permitindo assim o estudo de estruturas de alguns micrômetros, tais como trabéculas ósseas (Martin-Badosa et al., 2003; Gonzalez-Garcia & Monje, 2013).

Mediante o exposto sobre os diferentes tipos de superfícies de implantes, a carência de estudos envolvendo implantes nanotexturizados, que visam à melhora qualitativa e quantitativa do fenômeno de osseointegração, bem como a existência de eventos que tornam deficiente o processo de reparação tecidual em fumantes, é interessante avaliar uma superfície de implante de 4º geração, modificada pela adição de nano-hidroxiapatita, de forma comparativa a outras superfícies existentes no mercado, em um modelo ósseo deficiente *in vivo*, compreendendo ratos expostos à fumaça do cigarro.

2. Objetivos

2 – Objetivos

Avaliar *in vivo*, utilizando ratos expostos à fumaça do cigarro (como um modelo de reparação óssea deficiente) uma nova superfície de implantes com nanopartículas de hidroxiapatita (nanoHA), por meio de:

Análise microtomográfica: avaliação do osso em contato e nas áreas entre os ápices de rosca dos implantes, dos seguintes parâmetros tomográficos: Contato tridimensional ossoimplante (IS/TS, %); Densidade óssea tridimensional (BV/TV, %); Porcentagem da porosidade total (Po.To, %); Separação Trabecular (Tb.Sp, mm).

Análise histomorfométrica: avaliação do contato osso-implante (BIC, %) e da densidade óssea na área entre os ápices de rosca dos implantes (BAFO, %).

Avaliação da expressão gênica dos seguintes genes marcadores do metabolismo ósseo: analisar Fosfatase Alcalina (ALP), Osteopontina (OPN), Receptor ativador do fator nuclear kappa ligante (RANKL), Osteoprotegerina (OPG), Osteocalcina (OC) e Fator de transcrição "runt related 2" (RUNX2).

3. Materiais e Métodos

3 – Materiais e Métodos

3.1. Comissão de Ética

O presente projeto de pesquisa foi submetido à avaliação da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Campus da USP-Ribeirão Preto, tendo sido aprovado (protocolo número: 2015.1.910.58.5) (Anexo1). Os procedimentos iniciaram-se após a aprovação pela referida comissão e foram executados de acordo com as normas éticas regidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2. Cálculo amostral

O cálculo de tamanho da amostra foi realizado pelo programa Graphpad Statemate 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). A amostra ideal para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados obtidos neste estudo foi calculada considerando-se as médias e desvios-padrão do contato osso-implante encontrado nas análises histomorfométricas dos grupos experimentais do estudo desenvolvido por Nociti Jr. et al., (Nociti Junior et al., 2002), sendo o valor de α ajustado em 0,05. Dessa forma, chegou-se a um tamanho amostral adequado de 12 animais por grupo experimental, sendo 6 para cada tempo de análise. Considerando o percentual de morte de animais após indução da fumaça de cigarro ou realização dos procedimentos cirúrgicos para instalação dos implantes em estudos prévios realizados por nossa equipe (20%), foi solicitado um adicional de 12 animais para substituir qualquer perda eventual, totalizando 48 ratos.

3.3. Caracterização da amostra

Foram selecionados 36 ratos adultos machos da espécie Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com peso entre 200 a 250g, provenientes do biotério central do Campus da USP – Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas com alimento e água *ad libitum* antes e durante o período experimental, e permaneceram no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto em ambiente com ciclo de 12 horas de luz e temperatura entre 22 e 24°C.

3.4. Indução do tabagismo

Este estudo contou com a utilização efetiva de 36 ratos submetidos à fumaça de 10 cigarros, 3 vezes ao dia, durante 60 dias seguidos, de forma similar à adotada por César-Neto et *al.* 2003, que estimou o uso de uma concentração de 1,3 mg de nicotina, 16,5 mg de alcatrão e 15,2 mg de monóxido de carbono. Inicialmente, os animais passaram por um período de adaptação constituído de 2 dias: no primeiro dia ficaram expostos por 3 vezes durante 5 minutos; no segundo dia, por 3 vezes durante 7 minutos. A partir do terceiro dia, os animais foram expostos em 3 vezes diárias de 8 minutos (Cesar-Neto et al., 2003).

Estes ratos foram colocados durante o período de exposição em um recipiente de acrílico transparente, com dimensões de 45x20x20 cm³, composto por duas câmaras interligadas por um orifício. Na primeira, eram colocados os cigarros acesos. Nesta parte havia também uma entrada por onde era bombeado o ar por meio de um inalador de ar comprimido modelo Inalar Compact (NS, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil), de modo a formar uma corrente que direcionava a fumaça para a segunda câmara, na qual se encontravam os ratos. Na segunda câmara também havia um orifício que possibilitava a vazão do ar, bombeado para o meio externo (Lemesurier et al., 1981; Cendon-Filha, 1993). (Figura 1). A este orifício foi conectada uma mangueira de borracha de 2.2 cm de diâmetro e 3 metros de comprimento, de modo que a fumaça era direcionada para fora do biotério e lançada ao ar livre.



Figura 1. Desenho esquemático representando o mecanismo de exposição à fumaça. Observa-se a câmara 1, onde os cigarros eram colocados, e a câmara 2, na qual permaneciam os ratos durante o período de exposição à fumaça do cigarro.

3.5. Registro dos níveis de cotinina

O primeiro dia após o período de adaptação, no qual ocorreu exposição à fumaça do cigarro por 3 períodos de 8 minutos, foi considerado o dia 1 no presente estudo. A partir desta data foram contados mais 29 dias corridos e, após anestesia para instalação dos implantes, foi recolhido 1 ml de sangue de cada rato, extraído mediante punção venosa cardíaca (dia 30), para análise plasmática dos níveis de cotinina. A cotinina é um metabólito da nicotina que, por apresentar um tempo de meia vida mais longo, tem sido usado em pesquisa como um marcador confiável para estudos do hábito de fumar. A quantificação da cotinina foi realizada com a utilização de um kit de ELISA (mouse/rat cotinine ELISA, OriGene Technologies Inc., Rockville, MD, USA), conforme orientação do fabricante, e se repetiu uma semana após a instalação dos implantes (dia 37), previamente ao sacrifício dos grupos teste e controle -7 dias, e um mês após a instalação dos implantes (dia 60), previamente ao sacrifício dos grupos teste e controle -30 dias.

Todos os implantes utilizados foram fabricados pela empresa S.I.N. (S.I.N. Implant System, São Paulo, SP) para esta pesquisa, tinham a mesma macroestrutura, com formato de parafuso e as seguintes dimensões: 2,7 mm de comprimento e 1,4 mm de diâmetro (Figura 2).



Figura 2. Imagem representativa do implante utilizado.

3.6. Instalação dos implantes

A cirurgia para instalação dos implantes foi executada no trigésimo dia após a coleta da amostra de sangue para análise da cotinina, de forma similar ao protocolo utilizado por Prado et *al.*, 2006 (Prado et al., 2006). Entretanto, no presente estudo não houve a exposição à fumaça do cigarro momentos antes (procedimento adotado para diminuir o risco de perdas de animais durante o ato cirúrgico). Os animais foram inicialmente pesados para o correto

cálculo anestésico. A anestesia geral foi obtida pela associação de 50 mg/1kg de Cloridrato de Ketamina (Agener União Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e 10mg/1kg de Cloridrato de Xilazina (Rompum; Bayer SA, São Paulo, SP, Brasil) através de injeção via intramuscular. Logo após, os animais foram colocados em uma placa de contenção na posição de decúbito dorsal. Foi realizada a tricotomia e, em seguida, com o auxílio de uma tesoura de ponta fina, a assepsia local, utilizando uma solução de PVPI a 1%.

Subsequentemente, foi realizada uma incisão em ambas as pernas dos animais, com aproximadamente 1,5cm de extensão, paralela ao longo eixo das tíbias (Figura 3A). O local de eleição para a incisão foi estabelecido pela porção mais volumosa do tecido ósseo, mediante palpação. O tecido muscular foi seccionado até a exposição do periósteo, utilizando um cabo de bisturi nº 3, montado com lâmina de bisturi nº 15 (Swann-Morton, Sheffield, Inglaterra). O descolamento foi executado utilizando os descoladores de Freer e de Molt, com o auxílio de uma pinça clínica. Esses mesmos instrumentos auxiliaram no afastamento do retalho e estabilização da tíbia (Figura 3B). Como essa região não induz um sangramento excessivo, a secagem do campo operatório foi feita com gaze estéril.

A osteotomia para a instalação do implante foi realizada por meio de uma broca piloto com 1,0 mm de diâmetro e 15 mm de comprimento (S.I.N. – Sistema de Implantes) sob constante irrigação com soro fisiológico, de acordo com as recomendações especificadas pelo fabricante (S.I.N. – Sistema de Implante, São Paulo-SP) (Figura 3C). Os implantes foram instalados utilizando uma chave de 0,9 mm de diâmetro (Figura 3D) de forma que as roscas ficassem completamente introduzidas no interior do osso cortical (Figura 3E). O ato operatório finalizou-se com o fechamento primário dos tecidos por meio de suturas por planos, utilizando fios de sutura absorvíveis (Figura 3F) (Vicryl Ethicon 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil).



Figura 3. Instalação do implante. A – Incisão de aproximadamente 1,5 cm de extensão paralela ao longo eixa da tíbia; B – Retalho realizado; C – Perfuração para instalação do implante sobre constante irrigação; D – Instalação do implante; E – Implante posicionado; F – Retalho suturado.

Subsequentemente à cirurgia, os animais receberam uma dose única de antibiótico via intramuscular de 24000 Ul/kg de Penicilina G-benzatina na dose de 0,01 ml para cada 100g do peso corpóreo do rato (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge[®] Saúde Animal Ltda., Campinas, SP), e um anti-inflamatório (Buprenorfina na concentração de 0,3 mg/ml – dose 0,5 mg/kg - Injeção subcutânea, 12/12 horas). Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas durante todo o período experimental e não sofreram nenhuma restrição de movimentação ou alimentar.

3.7. Divisão dos grupos experimentais

Os 36 animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais, cada qual contendo 12 ratos:

 - GRUPO 1 (n=12) – Ratos expostos à fumaça – superfície lisa (LISA) - implantes usinados (sem nenhum outro tratamento de superfície a não ser os sulcos normais de usinagem) foram instalados nas tíbias de ratos expostos à fumaça do cigarro;

 - GRUPO 2 (n=12) – Ratos expostos à fumaça – superfície com duplo ataque ácido (DAA) - implantes com superfície tratada com duplo ataque ácido foram instalados nas tíbias de ratos expostos à fumaça do cigarro;

 - GRUPO 3 (n=12) – Ratos expostos à fumaça – superfície nano HA (NANO) implantes com superfície com adição de nano-hidroxiapatita foram instalados nas tíbias de ratos expostos à fumaça do cigarro;

Os animais foram sacrificados com aprofundamento anestésico de 150 mg/kg de tiopentato de sódio 2,5%, via intraperitoneal (Thiopentax, Cristália, Brasil) via intraperitoneal nos períodos de 7 e 30 dias após a instalação dos implantes (18 animais para cada tempo, 6 de cada um dos grupos experimentais).

As tíbias direitas foram removidas, com a utilização de uma tesoura, e fixadas para posterior análise tridimensional por MicroCT e processamento histológico/análise histomorfométrica. As tíbias esquerdas foram removidas com um auxílio de uma trefina de 3 mm de diâmetro, armazenadas em nitrogênio líquido e em seguida no freezer -80 graus para posterior análise da expressão gênica.

3.8. Análise microtomográfica

A análise microtomográfica foi realizada com a utilização de um microtomógrafo SkyScan 1172 (SKYSCAN N. V., Kontich, Bélgica) conectado a um computador de controle e aquisição de dados. As amostras, após serem imersas em formol tamponado durante 48 horas após o sacrifício dos animais, foram posicionadas e estabilizadas em um porta-amostra próprio ao equipamento, de modo a evitar qualquer tipo de movimento indesejável enquanto o escaneamento era processado.

O escaneamento foi executado de forma padronizada, sendo todos eles obtidos a partir de uma tensão de 100 kV e 100 μ A, com a utilização de um filtro de alumínio-cobre, visando a otimização do contraste, rotação de 360 graus, um passo de rotação de 0,40 e 5,87 mm de tamanho de pixel. As projeções tomográficas foram reconstruídas com a utilização do software NRecon (NRecon v.1.6.10.4, Bruker, Kontich, Antwerp, Bélgica) e os implantes foram posicionados no seu longo eixo, tendo como referência o corte sagital, utilizando o software DataViewer (v.1.5.0, Bruker, Kontich, Antwerp, Bélgica).

A partir do estabelecimento das posições adequadas, as imagens reconstruídas foram analisadas com a utilização do software CT Analyser (CTAn., v.1.15.4.0, Bruker, Kontich, Antwerp, Bélgica) para a quantificação dos seguintes parâmetros: contato tridimensional osso-implante (IS/TS, %); densidade óssea tridimensional (BV/TV, %); porcentagem da porosidade total (Po.To, %) e separação trabecular (Tb.Sp, mm).

No CTAn foi criada uma lista de tarefas para análise dos parâmetros desejados com a utilização da ferramenta de análise avançada "custom processing". As medições foram feitas a partir de 1 mm da porção mais coronal do implante, atingindo todo o seu comprimento ou até alcançar a quantia de 173 "slices". Esse processo envolveu a determinação da região de interesse (ROI). A soma coletiva de todos os ROIs sobre um conjunto contíguo de fatias da imagem transversal foi usada para determinar o volume de interesse desejado (VOI). Processou-se também uma binarização, realizada com a utilização de uma escala de cinza, com densidade de 35-150 para osso e 150-255 para o implante.

3.9. Preparo das peças para histomorfometria

Após a tomada tomográfica com os implantes instalados, as tíbias foram preparadas para a avaliação histomorfométrica (cortes não descalcificados).

Fixação e Descalcificação

Cada amostra foi colocada em frasco de vidro contendo o fixador: solução de formalina 4%, dissolvido em tampão fosfato de sódio (PBS) em pH 7, por 10 dias, à temperatura ambiente. Em seguida, as peças foram transferidas para uma solução de etanol a 70% até o seu processamento. Os espécimes foram desidratados em gradiente de etanol em concentrações ascendentes (soluções 70%, 95% e 100%).

Inclusão em Resina

Todas as peças foram infiltradas e incluídas em resina LR White (London Resin Company, Berkshire, Inglaterra).

<u>Secção</u>

As peças incluídas em resina foram submetidas a um sistema de microdesgaste (Exakt, Alemanha) pela técnica de secção de tecidos duros descrita por Donath & Breuner, 1982, de

forma a obter lâminas de aproximadamente 50 a 80 µm. Os cortes foram montados em lâminas histológicas para análise, sendo corados com *Stevenel's blue e Alizarin red S*.

Histomorfometria

Uma secção histológica longitudinal de 50-80µm de espessura de cada implante foi captada através de uma câmara de vídeo Leica DC 300F (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Alemanha) acoplada a um estereomicroscópio Leica MZFL III (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Alemanha). As imagens foram avaliadas utilizando o programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) para a quantificação da porcentagem de contato osso-implante (BIC, %) (Figura 4A), e da densidade óssea na área entre ápices implante (BAFO, %) 4B). os de roscas do (Figura



Figura 4. Esquema ilustrativo demonstrando as medições de BIC (A) e BAFO (B).

3.10. Análise da expressão gênica Extração de RNA total

As amostras ("pool" de duas tíbias com as mesmas superfícies de implantes e tempo de análise, perfazendo um total de 18 espécimes) foram colocadas separadamente em cadinhos de porcelana previamente queimado a 200° por 6 horas. Em seguida, foi acrescentado nitrogênio líquido e com auxílio de um pistilo foi realizado o maceramento das amostras, com movimento e força mecânica, até que todo tecido ósseo se destacasse do implante e obtivesse o aspecto "esfarelado". Sequentemente, foi adicionado 1 ml do reagente Trizol (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, EUA). Posterior a intensa pipetagem, para promover lise das células, esta mistura foi transferida para o próximo poço de cultura celular, sendo o mesmo procedimento realizado até o último poço. Ao final de 20 poços, obteve-se quantidade suficiente de RNA total para execução de todos os experimentos envolvendo expressão gênica. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 15 min e armazenadas no freezer -20°C por, no mínimo, 24h.

Após este período, para cada 1 mL do reagente Trizol (Gibco) foram adicionados 250 μ L de clorofórmio (Merck). Os tubos foram vigorosamente agitados por 30s e colocados no gelo durante 5 min. A seguir, ocorreu a centrifugação das amostras a 4°C e 12000 g, durante 15 min, e a fase aquosa (superior) coletada em novos tubos de 2 mL (Eppendorf AG, Hamburg, Hamburg, Alemanha). Em seguida, foram adicionados 250 μ L de etanol 96% (Merck) às amostras e as mesmas centrifugadas em colunas de sílica gel presentes no kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). O restante do processo de extração de RNA total foi realizado de acordo com instruções do fabricante.

A concentração e pureza do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria em aparelho NanoVue (GE Healthcare, Uppsala, Condado de Uppsala, Suécia). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm, para obtenção da concentração de RNA/µL e contaminação por proteínas e fenol, respectivamente. Apenas as amostras que apresentaram a proporção 260:280 e 260:230 maior que 1.8 foram consideradas para os ensaios de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) em tempo real. Em seguida, a integridade do RNA total foi analisada utilizando o equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Stockport, Manchester, United Kingdom). Brevemente, as amostras do RNA total foram aquecidas a 70°C por 2 minutos e mantidas no gelo até o momento da aplicação no gel. A matriz do gel aplicada nos capilares do chip contém uma mistura de fluoróforos e marcadores de peso molecular. A ligação dos fluoróforos ao marcador de tamanho e ao RNA resulta na emissão de fluorescência, que é quantificada, permitindo a separação do RNA ribossômico 18S e 28S e a verificação da integridade do RNA total a partir da atribuição de um número de integridade do RNA (RNA Integrity Number - RIN) que varia de 1 a 10. As amostras que apresentaram RIN maior ou igual a 7 foram consideradas para análise.

Síntese da fita de DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total por reação de transcrição reversa utilizando-se o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. Brevemente, em um tubo de 200 µL (Axygen Scientific Inc., Union City, California, EUA) foram adicionados: 1 µg de RNA total diluído em um volume final de 10 µL de água previamente tratada com DEPC (Sigma), 2 µL de (10X) RT buffer, 0,8 µL de (25X) dNTP mix (100mM), 2 µL (10X) RT Random Primers, 1 µL de MultiScribeTM Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase Inhibitor e 3,2 µL de água DEPC, para um volume
final de 20 μ L/reação. Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador Master Cycler Gradiente (Eppendorf AG) sob as seguintes condições: 25°C por 10 min, 37 °C por 120 min, 85 °C por 5 min, seguido pelo resfriamento a 4 °C. Ao final da reação de transcrição reversa as amostras de DNAc foram estocadas em freezer -20°C.

Reação de PCR em tempo real utilizando o sistema de sondas Taqman

Para realização da técnica de PCR em tempo real utilizou-se o sistema de sondas Taqman em um aparelho CFX 96 (Bio-Rad, Hercules, California, EUA). Para cada reação foram adicionados: 5 μ L de Taqman® Gene Expression Master Mix (2X)2, 0,5 μ L de (20X) Taqman® Gene Expression Master Mix e 4,5 μ L de cDNA (11,25 ng), para um volume final de 10 μ L/reação. As reações de amplificação consistem em 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e, 1 minuto a 60°C (desnaturação e extensão).

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cicle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) permitindo a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Todas as amostras foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para o gene de expressão constitutiva β -GUS, utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Os níveis de expressão do gene constitutivo foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo e uma amostra negativa (água) submetida à reação com cada sonda Taqman utilizada. A quantificação dos dados de expressão gênica foi realizada utilizando o método de 2- $\Delta\Delta$ CT (Livak e Schittgen, 2001). A avaliação da expressão gênica analisou Fosfatase Alcalina (ALP), Osteopontina (OPN), Receptor ativador do fator nuclear kappa ligante (RANKL), Osteoprotegerina (OPG), Osteocalcina (OC) e Fator de transcrição "runt related" 2 (RUNX2).

Todas as análises histomorfométricas, microtomográficas e de avaliação da expressão gênica foram realizadas por um único examinador, cego para os grupos experimentais.

3.11. Análise Estatística

Os níveis de cotitinina plasmática (teste ELISA) foram avaliados estatisticamente por meio do teste ANOVA Oneway seguido do pós-teste de Tukey. As análises de microtomografia, histomorfometria e expressão gênica tiveram suas análises preliminares mostrando que os dados satisfaziam a distribuição gaussiana (teste de Shapiro-Wilk, todas p>

0,05). Assim, os dados foram coletados e alinhados ao longo de um modelo linear geral (MLG) com fatores fixos de tempo (7 e 30 dias) e modificações de superfície (lisa, duplo ataque ácido e nano-hidroxiapatita). Teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas. Todas as análises foram apresentadas em função dos valores médios com o intervalo de confiança correspondente a 95% (média \pm 95% IC) e realizadas usando o software SPSS (IBM SPSS 23, IBM Corp., Armonk, Nova York, EUA).

4. Resultados

4. Resultados

Sete animais expostos à fumaça não sobreviveram a todo o período em que estava compreendido o experimento, de modo que 1 deles faleceu ainda no período de adaptação, 1 entre o dia 1 e o dia 30, 3 após a instalação dos implantes (dia 30), e 2 entre os dias 30 e 60, sendo estes substituídos por animais reservas de igual condição. Além disso, não foram detectados eventos adversos, como a exposição do implante, e foi observado um aspecto clinicamente saudável nas áreas cirúrgicas ao longo de todo o período experimental.

A análise plasmática dos níveis de cotinina mediante a realização de um exame de ELISA demonstrou um efeito acumulativo da fumaça do cigarro de modo que os índices aumentaram nos diferentes tempos de análise. Aos 30 dias de indução da fumaça os ratos apresentaram 46,09 \pm 7,26 (média + IC 95%) nanogramas de cotinina para cada mililitro, aos 37 dias, 51,20 \pm 7,26, e aos 60 dias, 72,37 \pm 7,26 (Figura 5).



Figura 5. Nível de cotinina plasmática, em nanogramas por mililitro, (média + IC 95%) nos diferentes tempos após a exposição dos ratos à fumaça do cigarro. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.

4.1. Resultados microtomográficos



Figura 6. (A-F) Reconstrução das imagens microtomográficas. Implante com superfície LISA (A e D), DAA (B e E) e NANO (C e F) instalados em tíbias de ratos expostos à fumaça de cigarro nos tempos: 7 Dias (A,B,C) e 30 Dias (D,E,F).

4.1.1. Contato tridimensional osso-implante (IS/TS, %)

A análise do contato tridimensional osso-implante demonstrou que aos 7 Dias o percentual de contato foi de $32,71 \pm 5,61$ (valores expressos em média \pm IC 95%), resultado sem diferença estatística do encontrado aos 30 Dias, $40,33 \pm 5,61$ (p=0,059) (Figura 7A). Ao comparar a porcentagem de contato osso-implante de acordo com o tipo de tratamento recebido pelas superfícies notou-se uma porcentagem superior para a superfície NANO (43,39 \pm 6,87) em relação às superfícies LISA ($36,29 \pm 6,87$) e DAA ($43,39 \pm 6,87$). Estes resultados demonstraram superioridade estatística significativa para a superfície NANO sobre a superfície LISA (p=0,008) e semelhança estatística entre NANO e DAA (NANO x DAA p=0,146), o que também foi observado entre DAA e LISA (DAA x LISA p=0,187) (Figura 7 B). Ao avaliar todos os grupos de forma isolada observou-se maiores médias de porcentagem de IS/TS para o grupo NANO aos 7 Dias e aos 30 Dias. Aos 7 dias, a média foi de 38,08 \pm 9,71. Estatisticamente não houve diferença significativa entre os grupos (NANO 7D x DAA 7D p=0,709; NANO 7D x LISA 7D p=0,052; DAA 7D x LISA 7D p=0,111). Aos 30 Dias, o grupo NANO (NANO 30D = 48,71 \pm 9,71) também demonstrou maior porcentagem de

contato osso-implante quando comparado aos grupos LISA ($35,24 \pm 9,71$) e DAA ($37,03 \pm 9,71$), mas sem diferença estatisticamente significante nas comparações entre os grupos (NANO 30D x DAA 30D p=0,093; NANO 30D x LISA 30D p=0,054; DAA 30D x LISA 30D p=0,791). Nas comparações intra-grupos para os diferentes tempos de análise, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (LISA 7D x LISA 30D p=0,121; DAA 7D x DAA 30D p=0,827; NANO 7D x NANO 30D p=0,125) (Figura 8).



Figura 7. Gráficos representando a porcentagem de contato tridimensional osso-implante (IS/TS %) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 8. Gráfico representando a porcentagem de contato tridimensional osso-implante (IS/TS, %) quando todos os grupos foram analisados de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significante para as análises feitas considerando uma mesma condição e tratamento de superfície para os diferentes tempos de avaliação.

4.1.2. Densidade óssea tridimensional (BV/TV, %)

A porcentagem da densidade óssea tridimensional apresentada aos 7 Dias foi de 32,38 \pm 5,68 (valores expressos em média \pm IC 95%), enquanto aos 30 Dias foi 31,66 \pm 5,68, de modo que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (p=0,856) (Figura 9A). Quando feita a análise comparativa entre os resultados apresentados de acordo com o tipo de tratamento de superfície dos implantes, houve ausência de diferença estatística entre os grupos LISA (26,95 \pm 6,95), DAA (34,01 \pm 6,95) e NANO (35,11 \pm 6,95) (LISA x DAA p=0,153; LISA x NANO p=0,100; DAA x NANO p=0,821) (Figura 9 B). Ao avaliar todos os grupos isoladamente, aos 7 Dias, o grupo NANO (NANO 7D 38,79 ± 9,83) apresentou superioridade estatística (p=0,042) quando comparado com o grupo LISA (LISA 7 D 24,33 \pm 9,83), e maior média numérica que a superfície DAA (DAA $34,03 \pm 9,83$), todavia sem diferença estatística significante (p=0,489). Entre os grupos DAA 7D e LISA 7D não houve diferença estatística (p=0,165). Aos 30 Dias as superfícies DAA e NANO apresentaram as maiores médias numéricas (LISA 30D 29,57 ± 9,83; DAA 30D 33,99 ± 9,83; NANO 30D 31.42 ± 9.83), mas não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (LISA 30D x DAA 30D p=0,521; LISA 30D x NANO 30D p=0,788; DAA 30D x NANO 30D p=0,709). As comparações intragrupos para os diferentes tempos não mostraram diferenças estatisticamente significantes (LISA 7D x LISA 30D p=0,447; DAA 7D x DAA 30D p=0,996; NANO 7D x NANO 30D p=0,288) (Figura 10).



Figura 9. Gráficos representando a porcentagem de volume ósseo pelo volume total de tecido (BV/TV, %) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 10. Gráfico representando a porcentagem de volume ósseo pelo volume total (BV/TV, %) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

4.1.3. Porcentagem de porosidade total (Po.To)

A porcentagem de porosidade total em função do tempo demonstrou que as médias aos 7 Dias (68,73 ± 5,32) (valores expressos em média ± IC 95%) e aos 30 Dias (68,34 ± 5,32) não diferem estatisticamente (p=0,916) (Figura 11A). Quando as comparações foram feitas em relação ao tipo de tratamento das superfícies, o grupo de superfície LISA apresentou uma média de 73,06 ± 6,52, enquanto a média para os grupos DAA e NANO foram 65,99 ± 6,52 e 66,56 ± 6,52 respectivamente, sem diferença estatisticamente significante entre os grupos (LISA x DAA p=0,128; LISA x NANO p=0,161; DAA x NANO p=0,901) (Figura 11B). Ao avaliar todos os grupos, aos 7 Dias, a média numérica foi maior para a superfície LISA (LISA 7D 75,68 ± 9,22), em relação aos grupos DAA e NANO (DAA 7D 65,98 ± 9,22; NANO 7D 64,54 ± 9,22), entretanto sem diferença estatisticamente significante entre os grupos (LISA 7D x DAA 7D p=0,139; LISA 7D x NANO 7D p=0,091; DAA 7D x NANO 7D p=0,824). Aos 30 Dias após instalação dos implantes as porcentagens de porosidade total foram: LISA 30D 70,43 ± 9,22; DAA 30D 66,01 ± 9,22; NANO 30D 68,58 ± 9,22, também sem diferenças estatísticas entre os grupos (LISA 30D x DAA 30D p=0,494; LISA 30D x NANO 30D p=0,774; DAA 30D x NANO 30D p=0,690). Nas comparações intragrupos entre os diferentes tempos não houve diferenças estatísticas (LISA 7D x LISA 30D p=0,418; DAA 7D x DAA 30D p=0,996; NANO 7D x NANO 30D p=0,532) (Figura 12).



Figura 11. Gráficos representando a porcentagem de porosidade total (Po.To, %) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 12. Gráfico representando a porcentagem de porosidade total (Po.To, %) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

4.1.4. Separação trabecular (Tb.SP, mm)

A separação trabecular (Tb.Sp, mm) em função do tempo encontrada aos 7 Dias foi de 0,050 \pm 0,004 (valores expressos em média \pm IC 95%) e aos 30 Dias de 0,056 \pm 0,004, de modo que não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos (p=0,067) (Figura 13A). Ao avaliar os grupos de acordo com os diferentes tipos de tratamento de superfície recebido pelos implantes obteve-se as seguintes médias: LISA 0,054 \pm 0,004; DAA 0,052 \pm 0,004; NANO 0,051 \pm 0,004. As comparações entre grupos não exibiram nenhuma diferença estatisticamente significante (LISA x DAA p=0,486; LISA x NANO p=0,393; DAA x NANO p=0,872) (Figura 13 B). Os resultados também foram analisados em função de todos os grupos isoladamente. Para o tempo de 7 Dias a maior separação trabecular foi encontrada para a superfície LISA (0,053 \pm 0,006) em relação às superfícies DAA (0,049 \pm 0,006) e NANO (0,048 \pm 0,006). Aos 30 Dias, todos os grupos (LISA, DAA e NANO) apresentaram separação trabecular com valor igual (0,055 \pm 0,006). Para todas as comparações entre os grupos realizadas aos 7 Dias e aos 30 Dias, bem como para comparações dentro de uma mesma superfície em tempos distintos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (p>0,05) (Figura 14).



Figura 13. Gráficos representando a separação trabecular (Tb.Sp, mm) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 14. Gráfico representando a separação trabecular (Tb.Sp, mm) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

4.2. Resultados histomorfométricos:

Independente do tempo da superfície dos implantes, uma osseointegração bem sucedida foi observada em todos os grupos conforme evidenciado na figura 15. A quantidade óssea crescente entre os tempos 7 e 30 dias após a instalação dos implantes nas áreas em contato com o implante e entre roscas também foi visualizada nas diversas superfícies e condições analisadas. De um modo geral, com relação ao tratamento de superfície, o grupo NANO apresentou maior contato ao implante, com locais de remodelação e formação de novo osso, quando comparado aos grupos LISA e DAA nos diferentes tempos.



Figura 15. A-F. Imagens histológicas coradas com Stevenel's blue e Vermelho de Alizarina de todos os grupos experimentais. Tempo de 7 Dias: A, B, C; e Tempo de 30 Dias: D, E, F. Implantes com superfície LISA: A, D; DAA: B, E; e NANO: C e F. Aumento de 10x.

4.2.1. Contato osso-implante (BIC, %)

A análise histomorfométrica apresentou uma porcentagem de contato osso implante com diferença estatisticamente significante para os diferentes tempos de avaliação: 7 dias $(35,67 \pm 5,67)$ (valores expressos em média \pm IC 95%) e 30 dias $(55,45 \pm 5,67)$ (p<0,001) (FIGURA 16A). Ao avaliar os resultados obtidos nas diferentes superfícies verificou-se um maior contato osso implante para o grupo tratado com a superfície NANO (49,10 \pm 6,98) em relação a superfície DAA (45,24 \pm 6,98) e LISA (42,35 \pm 6,98), mas sem diferença estatisticamente significante nas comparações entre os grupos (NANO x DAA p=0,430; NANO x LISA p=0,172; DAA x LISA p=0,554). (Figura 16B). A análise simultânea de todos os grupos de forma isolada também apresentou resultados superiores para a superfície NANO em relação a DAA e LISA, nos diferentes tempos (7 dias e 30 dias) (LISA 7D 32,69 \pm 9,87; DAA 7D 35,36 \pm 9,87; NANO 7D 38,97 \pm 9,87; LISA 30D 52,00 \pm 9,87; DAA 30D 55,11 \pm 9,87, NANO 30D 59,23 \pm 9,87), novamente sem diferenças estatísticas nas comparações entre os grupos (LISA 7D x DAA 7D p=0,699; LISA 7D x NANO 7D p=0,365; DAA 7D x NANO 7D p=0,601; LISA 30D x DAA 30D p=0,652; LISA 30D x NANO 30D p=0,298, DAA 30D x NANO 30D p=0,551). Houve diferenças estatisticamente significantes para todas as

comparações intragrupos entre os diferentes tempos (LISA 7D x LISA 30D p=0,008; DAA 7D x DAA 30D p=0,007; NANO 7D x NANO 30D p=0,006). (Figura 17).



Figura 16. Gráficos representando a porcentagem de contato osso-implante (BIC, %) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 17. Gráfico representando a porcentagem de BIC quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

4.2.2. Densidade óssea na área entre os ápices de rosca do implante (BAFO, %)

A porcentagem da densidade óssea na área entre os ápices de rosca do implante (BAFO, %) em função do tempo, foi para 7 dias igual a 42,54 \pm 5,72 (valores expressos em média \pm IC 95%) e de 57,78 \pm 5,72 para análises realizadas aos 30 dias. Esta diferença foi estatisticamente significante (p=0,001) (Figura 18A). Ao considerar os diferentes tipos de tratamento de superfície para os implantes, o grupo NANO (53,73 \pm 7,01) apresentou maior % de BAFO que os implantes do grupo LISA (50,45 \pm 7,01) e DAA (46,30 \pm 7,01), sem diferença estatística significante entre os grupos (NANO x LISA p=0,503; NANO x DAA p=0,136; LISA x DAA p=0,400), (Figura 18B). Ao avaliar todos os grupos, notou-se, dentro de um mesmo tempo, médias superiores para o grupo NANO (NANO 7D 47,51 \pm 9,91; DAA 7D 35,14 \pm 9,91; LISA 7D 44,96 \pm 9,91; NANO 30D 59,95 \pm 9,91; DAA 30D 57,47 \pm 9,91; LISA 30D 55,93 \pm 9,91) todavia sem diferença estatística significante foi encontrada na análise intragrupos para diferentes tempos (7 Dias x 30 Dias) apenas para os grupos DAA (DAA 7D x DAA 30D p=0,003) e NANO (NANO 7D x NANO 30D p=0,080), mas não para o grupo LISA (LISA 7D x LISA 30D p=0,120) (Figura 19).



Figura 18. Gráficos representando a densidade óssea na área entre os ápices de rosca do implante (BAFO, %) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 19. Gráfico representando a densidade óssea na área entre os ápices de rosca do implante (BAFO, %) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

4.3. Resultados expressão gênica

4.3.1. Fosfatase alcalina (ALP)

A expressão relativa da fosfatase alcalina (ALP) pelo GAPDH demonstrou maior média aos 7 Dias (0,96 ± 0,03) (valores expressos em média ± IC 95%) que aos 30 Dias (0,71 ± 0,03), sendo esta diferença estatisticamente significante (p<0,001) (Figura 20A). Quando o critério alvo foi o tipo de tratamento recebido pela superfície do implante, as médias foram: LISA 0,63 ± 0,04; DAA 0,82 ± 0,04; NANO 1,06 ± 0,04, com diferença estatisticamente significante entre todos os grupos (LISA x DAA p<0,001; LISA x NANO p<0,001; DAA x NANO p<0,001) (Figura 20 B). Ao avaliar os resultados de todos os grupos isoladamente observou-se, aos 7 Dias, as seguintes médias: LISA 1,00 ± 0,05; DAA 0,95 ± 0,05; NANO 0,94 ± 0,05, sem diferença estatisticamente significante quando realizadas as comparações (LISA 7D x DAA 7D p=0,170; LISA 7D x NANO 7D p=0,106; DAA 7D x NANO 7D p=0,799). Entretanto, aos 30 Dias a expressão de ALP diminuiu para as superfícies LISA e DAA e aumentou para a superfície NANO (LISA 30D 0,27 ± 0,05; DAA 30D 0,70 ± 0,05; NANO 30D 1,18 \pm 0,05), havendo então diferença estatisticamente significante para todas as comparações (LISA 30D x DAA 30D p<0,001; LISA 30D x NANO 30D p<0,001; DAA 30D x NANO 30D p<0,001). Houve diferenças estatisticamente significantes para todas as análises intragrupos, entre os diferentes tempos: LISA 7D x LISA 30D p<0,001; DAA 7D x DAA 30D p<0,001; NANO 7D x NANO 30D p<0,001 (Figura 21).



Figura 20. Gráficos representando a expressão relativa de Fosfatase Alcalina/GAPDH (ALP/GAPDH) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 21. Gráfico representando a expressão relativa de Fosfatase Alcalina/GAPDH (ALP/GAPDH) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

4.3.2. Osteopontina (OPN)

A expressão relativa de osteopontina/GAPDH demonstrou diferença estatística significante (p<0,001), com superioridade dos resultados apresentados aos 7 Dias (1,25 \pm 0,03) (valores expressos em média \pm IC 95%) em relação aos 30 Dias (0,87 \pm 0,03) (Figura 22 A). Ao avaliar os grupos de acordo com o tipo de tratamento da superfície do implante, o grupo NANO exibiu maior média (1,69 \pm 0,04), quando comparado aos grupos LISA (0,61 \pm (0.04) e DAA (0.87 ± 0.04) , com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (NANO x DAA p<0,001; NANO x LISA p<0,001; DAA x LISA p<0,001) (Figura 22 B). Ao avaliar todos os grupos de forma isolada, aos 7 Dias e aos 30 Dias o grupo NANO apresentou as maiores médias (LISA 7D 1,00 \pm 0,05; DAA 7D 0,98 \pm 0,05; NANO 7D 1,77 \pm 0,05; LISA 30D 0,22 \pm 0,05; DAA 30D 0,76 \pm 0,05; NANO 30D 1,62 \pm 0,05). Houve differences estatisticamente significantes entre: LISA 7D x NANO 7D p<0,001; DAA 7D x NANO 7D p<0,001; LISA 30D x DAA 30D p<0,001; LISA 30D X NANO 30D p<0,001; DAA 30D x NANO 30D p<0,001; entretanto, não foi encontrada diferença entre LISA 7D x DAA 7D (p=0,586). As comparações intragrupos mostraram diferenças estatísticas significantes para todas as análises avaliando diferentes tempos (LISA 7D x LISA 30D, DAA 7D x DAA 30D, NANO 7D x NANO 30D), com valor de p<0,001. (Figura 23).



Figura 22. Gráficos representando a expressão relativa de Osteopontina/GAPDH (OPN/GAPDH) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 23. Gráfico representando a expressão relativa de Osteopontina/GAPDH (OPN/GAPDH) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

4.3.3. Receptor ativador do fator nuclear kappa ligante (RANKL)

A expressão relativa do receptor ativador do fator nuclear Kappa ligante (RANKL) em função do tempo foi, para o grupo sacrificado aos 7 Dias, igual a 0,90 \pm 0,05 (valores expressos em média \pm IC 95%), e para o grupo sacrificado aos 30 Dias, de 0,48 \pm 0,05, havendo diferença estatística significante entre eles (p<0,001) (Figura 24 A). Quando feita a avaliação dos resultados usando como critério o tipo de tratamento recebido pela superfície do implante, foram encontradas as seguintes médias: LISA 0,58 \pm 0,06; DAA 0,80 \pm 0,06; NANO 0,69 \pm 0,06 com diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos (LISA x DAA p<0,001; LISA x NANO p=0,011; DAA x NANO p=0,020) (Figura 24 B). Ao avaliar todos os grupos aos 7 Dias, as médias foram: LISA 7D 1,00 \pm 0,06; DAA 7D 1,22 \pm 0,06; NANO 7D \pm 0,06, e aos 30 dias: LISA 30D 0,16 \pm 0,06; DAA 30D 0,37 \pm 0,06; NANO 30D 0,92 \pm 0,06. Houve diferença estatisticamente significante entre todos os grupos (p<0,05). Nas comparações intragrupos entre os diferentes tempos também foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos (p<0,05). NAS DAA 7D x DAA 30D p<0,001; NANO 7D x NANO 30D p<0,001) (Figura 25).



Figura 24. Gráficos representando a expressão relativa do receptor ativador de fator nuclear Kappa ligante (RANKL) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 25. Gráfico representando a expressão relativa do receptor ativador de fator nuclear Kappa ligante (RANKL) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

4.3.4. Osteoprotegerina (OPG)

A expressão relativa de OPG/GAPDH demonstrou maior média numérica aos 30 Dias $(1,87 \pm 0,19)$ (valores expressos em média \pm IC 95%) em relação a 7 Dias $(1,77 \pm 0,19)$, mas

sem diferença estatisticamente significante entre os grupos (p=0,429) (Figura 26A). Ao comparar os resultados de acordo com a superfície do implante, o grupo NANO exibiu maior expressão relativa de OPG que os grupos LISA e DAA (NANO 2,75 \pm 0,24; LISA 0,99 \pm 0,24; DAA 1,72 \pm 0,24), sendo a diferença entre esses grupos estatisticamente significante (NANO x LISA p<0,001; NANO x DAA p<0,001; DAA x LISA p<0,001). (Figura 26 B). Ao avaliar os resultados com todos os grupos isoladamente, também foram observadas, aos 7 Dias e aos 30 Dias, maiores médias para o grupo NANO em relação às superfícies LISA e DAA (LISA 7D 1,00 \pm 0,33; DAA 7D 1,98 \pm 0,33; NANO 7D 2,33 \pm 0,33, LISA 30D 0,99 \pm 0,33; DAA 30D 1,47 \pm 0,33; NANO 30D 3,17 \pm 0,33). Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre: LISA 7D x DAA 7D (p<0,001), LISA 7D x NANO 7D (p=0,137). As análises das diferenças intragrupos para diferentes tempos mostrou diferenças estatisticamente significantes significantes significantes significantes and the significantes para DAA 7D x DAA 30D (p=0,035) e NANO 7D x NANO 30D (p=0,001), mas não para LISA 7D x LISA 30D (p=0,948) (Figura 27).



Figura 26. Gráficos representando a expressão relativa de osteoprotegerina/GAPDH (OPG/GAPDH) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 27. Gráfico representando a expressão relativa de osteoprotegerina/GAPDH (OPG/GAPDH) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

4.3.5. RANKL/OPG

A expressão relativa de (RANKL/OPG)/GAPDH foi maior aos 7 Dias (0,61 \pm 0,03) (valores expressos em média + IC 95%) em relação ao período de 30 Dias (0,23 \pm 0,03), com diferença estatisticamente significante (p<0,001) (Figura 28A). Ao classificar os grupos de acordo com o tipo de tratamento da superfície do implante, a superfície LISA apresentou maior média na relação RANKL/OPG (LISA 0,58 \pm 0,04) seguida da superfície DAA (0,43 \pm 0,04) e NANO (0,25 \pm 0,04), com diferenças estatisticamente significantes (p<0,001) entre os grupos (Figura 28B). Ao comparar todos os grupos de forma isolada, aos 7 dias, o grupo LISA apresentou a maior média (LISA 7D 1,00 \pm 0,06; DAA 7D 0,62 \pm 0,06; NANO 0,20 \pm 0,06); aos 30 Dias os resultados se inverteram, e o grupo NANO foi quem mostrou valores mais elevados para RANKL/OPG (NANO 30D 0,29 \pm 0,06; DAA 30D 0,25 \pm 0,06, LISA 30D 0,15 \pm 0,06). Diferença estatisticamente significante foi encontrada aos 7 Dias para: LISA 7D x DAA 7D (p<0,001), LISA 7D x NANO 7D (p<0,001), DAA 7D x NANO 30D (p=0,021), LISA 30D x NANO 30D (p=0,003), mas não entre DAA 30D x NANO 30D (p=0,357). Observou-se diferença

estatisticamente significante em todas as comparações intragrupos: LISA 7D x LISA 30D (p<0,001), DAA 7D x DAA 30D (p<0,001), NANO 7D x NANO 30D (p<0,001) (Figura 29).



Figura 28. Gráficos representando a expressão relativa de (RANKL/OPG)/GAPDH organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 29. Gráfico representando a expressão relativa de (RANKL/OPG)/GAPDH quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

4.3.6. Osteocalcina (OC)

A expressão relativa de osteocalcina/GAPDH foi maior aos 30 Dias $(1,92 \pm 0,11)$ (valores expressos em média \pm IC 95%) do que aos 7 Dias (0,80 \pm 0,11). Essa diferença entre as médias foi estatisticamente significante (p<0,001) (Figura 30A). Quando as diferentes superfícies foram avaliadas, encontrou-se maior média para o grupo NANO $(1,86 \pm 0.13)$ em relação aos grupos DAA (1.31 ± 0.13) e LISA (0.90 ± 0.13) , com diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos (LISA, DAA e NANO, p<0,001) (Figura 30B). Quando realizada a análise da expressão relativa de osteocalcina em todos os grupos de forma isolada observou-se, aos 7 dias, maior média para a superfície LISA (LISA 7D 1,00 \pm 0,19; DAA 7D $0,59 \pm 0,19$; NANO 7D $0,81 \pm 0,19$) Diferença estatisticamente significante foi encontrada entre LISA 7D x DAA 7D (p=0,004); para as outras comparações, não houve diferença significante (LISA 7D x NANO 7D p=0,145; DAA 7D x NANO 7D p=0,102). Aos 30 Dias, a expressão gênica foi maior para o grupo NANO (2.91 ± 0.19) em relação às superfícies LISA (0.81 ± 0.19) e DAA (2.04 ± 0.19) . Diferença estatisticamente significante foi encontradas em todas as comparações entre os grupos, com p<0,001. Nas comparações intragrupos, houve diferenças estatisticamente significantes para grupos DAA e NANO (p<0,001), mas não para a superfície LISA (LISA 7D x LISA 30D, p=0,140) (Figura 31).



Figura 30. Gráficos representando a expressão relativa de Osteocalcina/GAPDH (OC/GAPDH) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 31. Gráfico representando a expressão relativa de Osteocalcina/GAPDH (OC/GAPDH) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias, e letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

4.3.7. Fator de transcrição "runt related" 2 (RUNX2)

A expressão relativa de RUNX2/GAPDH em função do tempo evidenciou maiores médias aos 7 Dias (0,97 ± 0,02) (valores expressos em média ± IC 95%) do que aos 30 Dias (0,86 ± 0,02), com diferença estatisticamente significante entre os grupos (p<0,001) (Figura 32A). Os resultados em função da superfície do implante exibiram as seguintes médias: LISA 0,70 ± 0,03; DAA 0,77 ± 0,03; NANO 1,28 ± 0,03, com diferenças estatísticas significantes para todas as comparações (LISA x DAA p<0,001; LISA x NANO p<0,001; DAA x NANO p<0,001) (Figura 32B). Ao avaliar de forma isolada todos os grupos, os resultados demonstraram aos 7 Dias maiores médias para o grupo NANO (LISA 7D 1,00 ± 0,04; DAA 7D 0,85 ± 0,04; NANO 7 D 1,08 ± 0,04), resultado que se repetiu aos 30 Dias (LISA 30D 0,40 ± 0,04; DAA 30 D 0,70 ± 0,04; NANO 30 D 1,48 ± 0,04). Para todas as comparações realizadas aos 7 Dias e aos 30 Dias, bem como para comparações intragrupos entre os diferentes tempos, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, com p<0,05. (Figura 33).



Figura 32. Gráficos representando a expressão relativa do Fator "runt related" 2/GAPDH (RUNX2/GAPDH) organizados em função do tempo (A) e da superfície do implante (B) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.



Figura 33. Gráfico representando a expressão relativa do Fator "runt related" 2/GAPDH (RUNX2/GAPDH) quando todos os grupos se apresentam de forma isolada expostos através de suas médias e intervalo de confiança (95%). Letras minúsculas representam as análises de 7 Dias. Letras maiúsculas as análises de 30 Dias. Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante. O sinal de + indica diferença estatística significativa para as análises feitas considerando o mesmo tratamento de superfície e diferentes tempos de avaliação.

5. Discussão

5. Discussão

Os implantes dentários alcançaram altos índices de sucesso para a substituição dos dentes perdidos ou ausentes. Entretanto, modificações nas suas características continuam ocorrendo, tendo como principais objetivos a redução no tempo final do tratamento e maiores índices de sucesso em situações clínicas desafiadoras. Para isto, diferentes metodologias são utilizadas visando melhoras no padrão de cicatrização óssea, dentre as quais: mudanças no design (Lemons et al., 1999), adição de compostos biológicos (Liu et al., 2004) e alterações na superfície (Park et al., 2005).

Não obstante as altas taxas de sucesso, falhas na osseointegração tem sido relacionadas ao indivíduo ou a fatores externos, dentre os quais destaca-se o tabagismo (Stefani et al., 2002). Vários estudos demostraram a influência negativa do hábito de fumar na densidade e volume ósseos, bem como na estrutura trabecular e no número de osteoblastos, células chaves no processo de reparo ósseo e na interação com o implante dentário. (Ajiro et al., 2010; Bain CA, 1996; Malas et al., 2016).

O presente estudo analisou uma nova superfície de implantes recoberta com nanopartículas de hidroxiapatita (Nano HA), comparando-a com implantes usinados e implantes que receberam em sua superfície duplo ataque ácido, instalados na tíbia de ratos expostos à fumaça de cigarro (como um modelo de reparação óssea deficiente) através de: análises microtomográfica (micro-CT), histomorfométrica, e da avaliação da expressão de genes marcadores do metabolismo ósseo.

Neste estudo os ratos foram expostos à fumaça do cigarro durante 60 dias (descartado o período de adaptação). Os níveis de cotinina plasmática foram avaliados aos 30, 37 e 60 dias após o início do experimento, e o que se notou foi um crescente na taxa de cotinina plasmática (30 dias: 46,10 ng/ml; 37 dias: 51,10 ng/ml, 60 dias 73,37 ng/ml). A avaliação utilizando um biomarcador foi citada na literatura como uma forma mais precisa do que o autorrelato para quantificar o grau de exposição ao tabagismo (Duque et al., 2017). Comparações com outros estudos dos resultados obtidos não foram realizadas devido a especificidade do kit para uso em ratos e ausências de artigos científicos utilizando o mesmo kit adotado nesta pesquisa. Vale ressaltar que maiores níveis de cotinina foram associadas a um risco aumentado ou

maior grau de periodontite em animais e em humanos (Nociti et al., 2001; Takeuchi et al., 2012; Tanaka et al., 2013; Ebersole et al., 2014).

A microtomografia computadorizada é considerada uma técnica de aquisição de imagens tridimensionais muito sensível para medir a massa óssea e a microestrutura do osso alveolar ao redor de implantes, e que possui como vantagens alta resolução e não destrutividade da amostra (Sarve et al., 2011; Slyfield et al., 2012; Molon et al., 2013). O presente estudo evidenciou, através da microtomografia, maiores valores numéricos de contato tridimensional osso implante (IS/TS %) para a superfície NANO aos 7 dias e aos 30 dias, quando comparada às superfícies LISA e DAA (entretanto, sem diferenças estatisticamente significantes). Esses resultados corroboram os achados de outros estudos (Alenezi et al., 2013; Yuan et al., 2018), que apresentaram melhores resultados para a superfície com nanotopografia em comparação com as superfícies lisas/usinadas ou que receberam apenas um duplo ataque ácido.

A análise da relação do volume ósseo/pelo volume total (BV/TV %) apresentou melhores resultados para o grupo NANO, quando comparado à superfície LISA no tempo de 7 dias, o que indica uma maior densidade óssea, com a presença de um osso mais compacto. Resultado favorável para o grupo de implantes nanotexturizados também foi encontrado por Fu et al., ao analisar a relação do volume ósseo pelo volume total (BV/TV) em cães da raça beagle 12 semanas após a instalação de implantes usinados, microtexturizados e micronanotexturizados (Fu et al., 2017).

Uma alta porcentagem de poros totais pode indicar uma menor densidade óssea. Cyprus et al., 2018, em estudo realizado com a administração intraperitoneal de extrato do cigarro em camundongos, demostrou uma relação direta entre dose e porosidade óssea (quanto maior a dose administrada, mais poroso o osso se apresentava). O presente estudo demonstrou que as superfícies DAA e NANO apresentaram menor porosidade total quando comparada a superfície LISA, sem diferença estatística significante entre os grupos de superfície com rugosidades, e essa presença de um osso mais denso ao redor do implante pode contribuir para a sua estabilidade.

A separação trabecular não mostrou diferenças significantes entre os grupos tantos aos 7 como aos 30 dias (havendo um pequeno aumento nos valores de 7 para 30 dias em todos os grupos). Os dados colapsados por tipo de superfície apontaram resultados numericamente menores para a superfície NANO, embora sem diferenças estatísticas entre os grupos. Este achado difere do encontrado por Cheng et al., que em um estudo utilizando implantes com

superfície nanotexturizada instalados em fêmures de ratos após 12 semanas de sua implantação, ou seja, em um tempo maior do que o analisado no presente estudo, encontrou maiores separações para o grupo de implantes usinados quando comparados aos grupos de implantes com estrutura em escala nanométrica. Su et al., utilizando discos de titânio com nanotopografia e revestimento com diferentes íons bioativos, também demonstraram maior separação trabecular para a superfície usinada após 8 semanas da implantação em fêmures de ratos.

A análise histomorfométrica do contato osso-implante (BIC %) mostrou uma porcentagem crescente de valores entre as diferentes superfícies (LISA, DAA e NANO respectivamente), tanto aos 7 dias como aos 30 dias, embora sem diferenças estatisticamente significantes. Este achado também foi observado por Correa et al., em um estudo envolvendo implantes usinados/lisos e implantes que receberam jato de óxido de alumínio em ratos expostos à fumaça de cigarro (Correa et al., 2008), e por Rouhabia et al., que utilizou um extrato de nicotina injetado em ratos e observou maior BIC nos implantes com características superficiais produzidas pelo óxido de alumínio comparado a implantes com superfície usinada (Rouhabia et al., 2018).

Os resultados histomorfométricos de densidade óssea mensurada na área entre os ápices de rosca do implante (BAFO, %), mostraram que a superfície com hidroxiapatita em escala nanométrica apresentou numericamente maiores valores médios nos diferentes tempos, embora novamente sem diferenças estatísticas entre os grupos. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Schlegel et al., 2013, que avaliaram a densidade óssea em porcos sistemicamente comprometidos (diabéticos), e encontraram valores superiores de densidade, aos 30 dias e 90 dias, para a superfície nanoestruturada quando comparada a uma superfície com duplo ataque ácido somente, e por Johansson et al., que compararam em coelhos implantes de polieteretercetona revestidos com hidroxiapatita em escala nanométrica com implantes similares, mas sem o revestimento, e também encontraram maiores valores numéricos de %BAFO para os implantes revestidos com nano HA, ainda que sem diferença estatística entre os grupos.

Apesar de vários estudos indicarem que a diferenciação osteoblástica é fortemente atingida pela exposição à fumaça do cigarro, ou demais formas de interação com as substâncias do cigarro, representada pela diminuição dos níveis de: RUNX2, ALP, OC, OPN e OPG (Rouhabia et al., 2018, Cyprus et al., 2018, Tanaka et al., 2013), o presente estudo

demonstrou que nos implantes tratados com a superfície NANO estes índices se apresentaram mais elevados do que nos implantes LISA e DAA, em especial na análise aos 30 Dias e nos gráficos em função da superfície.

RUNX2 é considerado um marcador precoce nos estágios de mineralização (Biguetti et al., 2017). Os resultados do presente estudo mostraram, aos 7 Dias $(0,97 \pm 0,02)$, uma média com diferença estatisticamente significante quando comparada aos 30 Dias $(0,86 \pm 0,02)$ (gráfico em função do tempo). Esses achados corroboram os encontrados por Biguetti et al., que observaram um nível maior de mRNA nos períodos de 7 e 14 dias, mas uma diminuição significativa para 21 dias. Todavia, quando os grupos foram separados, observouse concordância com Biguetti et al. (2017) para os grupos LISA e DAA, pois no grupo NANO houve um aumento da expressão do gene entre 7 Dias e 30 Dias. Segundo Franck et al., os benefícios da expressão de RUNX2 regulada pra cima podem ser explicados pela associação deste marcador com diferenciação osteoblástica, que é essencial para a morfogênese esquelética e formação óssea, estimulando o reparo ósseo.

No presente estudo, a análise da fosfatase alcalina (ALP) mostrou médias similares estatisticamente entre os grupos aos 7 Dias (LISA 7D 1,00 \pm 0,03; DAA 7D 0,95 \pm 0,03; NANO 7D 0,94 \pm 0,03); entretanto, no período de 30 Dias, os grupos LISA (LISA 30D 0,27 \pm 0,03) e DAA (DAA 30D 0,69 \pm 0,03) apresentaram uma diminuição da expressão de ALP. Essa diminuição da expressão de ALP está de acordo com os achados de Biguetti et al., em um estudo após instalação de implante em maxila de ratos, o qual observou que a ALP aumentava até o dia 7, mas tinha uma diminuição gradual após esse período (tempos 14 e 21 dias). Já a superfície NANO apresentou um aumento na sua expressão (NANO 30D 1,18 \pm 0,03), resultado similar ao encontrado por Nune et al., que observaram maior expressão desse gene em implantes com nanoestrutura do que nos implantes que não receberam a anodização, e maior expressão no período mais tardio (14 dias) do que no período mais precoce (7 dias).

Em relação à análise da Osteocalcina, seu nível aumentou de forma estatisticamente significante entre 7 Dias e 30 Dias ($0,80 \pm 0,11$ e $1,92 \pm 0,11$ respectivamente). Este resultado está de acordo com o achado por Cyprus et al., 2018. Na avaliação da osteocalcina em função da superfície, o grupo NANO apresentou superioridade estatística quando comparado às superfícies LISA e DAA. Jimbo et al., em um estudo no qual foram instalados implantes com diferentes superfícies em coelhos, também observou, após 4 semanas, maior expressão de osteocalcina para o grupo com revestimento de fosfato de cálcio em escala nanométrica em

relação ao grupo sem revestimento. A OC é um forte indicador da diferenciação de osteoblastos (Yonezawa et al., 2011), expressão temporal e maturação de proteínas da matriz extracelular, como fibronectina (Jimbo et al., 2007) ou colágeno tipo I (Franceschi & Iyer, 1992; Jimbo et al., 2010), que são essenciais para a mineralização.

A expressão da Osteopontina foi estatisticamente superior aos 7 Dias $(1,25 \pm 0,03)$ em relação ao período de 30 Dias $(0,87 \pm 0,03)$, e também foi maior nos implantes com superfície NANO do que nos de superfícies DAA e LISA. Estes achados estão de acordo aos encontrados por DeOliveira & Nanci, 2004, que utilizando cultura de células em discos de titânio observaram maior expressão gênica para os discos nanotexturizados em relação a outros discos, em especial nos estágios mais precoces da osteogênese. A Osteopontina reage com as integrinas da superfície celular, as quais por sua vez regulam a adesão, migração e proliferação celular.

A OPG é um receptor que previne a osteoclastogênese, e que tende a diminuir frente à exposição aos produtos do cigarro (Cyprus et al., 2018). No presente estudo, o grupo de superfície NANO apresentou as maiores médias de OPG aos 7 dias e 30 dias em relação às outras superfícies, corroborando os achados de Cyprus et al., 2018, encontrados em meio de cultura de células sobre discos de titânio expostos ao extrato de fumaça do cigarro, os quais demonstraram que superfícies com microrugosidade apresentaram maior nível de OPG que os discos de superfície lisa. Este aumento é especialmente relevante na medida que a OPG, ligando-se ao RANKL, inibe a diferenciação dos osteoclastos e bloqueia a interação RANK-RANKL (Franck et al., 2017).

Por outro lado, o RANKL, um promotor clássico da osteoclastogênese, tende a apresentar aumento na sua expressão mediante a exposição aos produtos do cigarro, o que contribui negativamente para a relação RANKL/OPG (Cyprus et al., 2018, Giorgetti et al., 2010). Segundo Biguetti et al., 2018, em estudo realizado após a instalação de implantes em área alveolar edêntula de camundongos com períodos de análise de 3, 7, 14 e 21 dias, esta expressão tende a ser maior nas fases mais tardias da cicatrização óssea (14 dias e 21 dias). Este estudo apresentou menor média de RANKL para o grupo NANO aos 7 Dias, e maior para o mesmo grupo no período de 30 Dias. Entretanto, quando realizada a análise da relação RANKL/OPG, o grupo NANO foi o que apresentou melhor taxa relativa, indicando um melhor equilíbrio entre reabsorção/formação óssea.

Os resultados obtidos pelo conjunto de todos esses genes de forma associada indicam uma maior atividade osteogênica, com estímulo à maior formação futura de osso ao redor dos implantes com nanoestrutura. Entretanto, como a maioria dessa maior atividade foi no período de observação de 30 dias, talvez o tempo do estudo tenha sido insuficiente para estas diferenças não se apresentarem estatisticamente significantes nos achados microtomográficos e histomorfométricos (embora em vários deles os resultados em 30 dias tenham favorecido numericamente o grupo NANO). A análise de um "n" maior de animais e/ou períodos observacionais mais longos (60, 90 ou 120 dias) talvez pudessem mostrar significância nas diferenças entre grupos para os parâmetros de análise da expressão das proteínas da cascata osteogênica avaliadas por expressão gênica, para quantificar quanto da ativação genética realmente foi transcrito em proteína, em tempos mais longos (60 ou 90 dias).

O presente estudo não utilizou um grupo controle com ratos não expostos à fumaça do cigarro. Estudo recente do nosso grupo de pesquisa avaliou as mesmas superfícies de implantes do presente estudo, com a mesma metodologia experimental, em um modelo de cicatrização óssea deficiente constituído por ratos diabéticos e contando com um grupo controle de ratos saudáveis. Os resultados foram expressivamente superiores para a superfície NANO nas análises de microtomografia, histomorfometria e expressão gênica (Oliveira et al., 2018), principalmente no modelo ósseo deficiente, e mostraram ainda que os animais saudáveis tiveram reparo ósseo significantemente superior aos diabéticos. Desse modo, como uma continuidade de linha de pesquisa, tendo em vista vários estudos prévios na literatura mostrando resultados de superfície nanotexturizada em animais saudáveis, e ainda levando em conta princípios éticos de experimentação animal, que recomendam o uso do menor número de espécimes necessários, optou-se por trabalhar apenas com animais submetidos à aspiração de fumaça do cigarro, qualificando os grupos de superfícies como controle negativo (LISA), positivo (DAA) e experimental (NANO).

Finalmente, é importante ressaltar que os resultados encontrados no presente estudo, de relativa superioridade da superfície NANO em relação às outras estudadas, em animais com reparo ósseo comprometido pela inalação de fumaça de cigarro, de modo algum significam uma justificativa para a continuidade do hábito de fumar. Como promotor de saúde, o profissional deve sempre estimular o paciente a abandonar o tabagismo, que é deletério à saúde como um todo, e ao longo do tempo tende a diminuir o sucesso e sobrevivência de implantes, independente do tipo de superfície utilizada. Além disso, a extrapolação clínica dos resultados aqui encontrados não é recomendada: os achados do presente estudo sugerem e dão suporte a uma superioridade da superfície NANO em indivíduos tabagistas, mas são necessários estudos clínicos controlados aleatorizados para testar se esta hipótese se sustenta em humanos.

6. Conclusão

6. Conclusão

Os resultados demonstraram superioridade da superfície NANO em relação às superfícies DAA e LISA, em ratos submetidos à inalação da fumaça de cigarro como um modelo de reparo ósseo deficiente, principalmente em relação aos parâmetros avaliados nas análises de expressão gênica. Entretanto, os resultados morfométricos (microCT e histomorfometria) apontaram um número limitado de parâmetros com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos mesmo na análise após 30 dias da instalação do implante, o que sugere um atraso no processo no processo de reparo ósseo em todos os animais, que não foi totalmente compensado por nenhuma superfície até este período de tempo.

7. Referências Bibliográficas
7. Referências Bibliográficas

Ajiro Y, Tokuhashi Y, Matsuzaki H, Nakajima S, Ogawa T. Impact of passive smoking on the bones of rats. Orthopedics. 2010(33):90–95.

Alenezi A, Naito Y, Andersson M, Chrcanovic BR, Wennerberg A, Jimbo R. Characteristics of 2 Different Commercially Available Implants with or without Nanotopography. International Journal of Dentistry. 2013.

Bai L, Liu Y, Du Z, Weng Z, Yao W, Zhang X, Huang X, Yao X, Crawford R, Hang R, Huang D, Tang B, Xiao Y. Differential effect of hydroxyapatite nano-particle versus nano-rod decorated titanium micro-surface on osseointegration. Acta Biomaterialia. 2018(76):344-58.

Baig MR, Rajan M. Effects of smoking on the outcome of implant treatment: a literature review. Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research. 2007;18(4):190-5.

Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. The International journal of oral & maxillofacial implants. 1993;8(6):609-15.

Bain CA. Smoking and implant failure- Benefits of a smoking cessation protocol. Int J Oral Maxillofac Implants. 1996(11):756–9.

Baskar K, Anusuya T, Devanand Venkatasubbu. Mechanistic investigation on microbial toxicity of nano hydroxyapatite on implant associated pathogens. Materials Science ans Engineering. 2017;(73):8-14.

Biguetti CC, Cavalla F, Silveira EM, Fonseca AC, Vieira AE, Tabanezi AP, Rodrigues DC., Trombone APF, Garleti GP. Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization. J Appl Oral Sci. 2018;26:e20170601.

Blair JM, Zhou H, Seibel MJ, Dunstan CR. 2006. Mechanisms of disease: Roles of opg, rankl and rank in the pathophysiology of skeletal metastasis. Nat Clin Pract Oncol. 3(1):41-49.

Braceras I, De Maeztu MA, Alava JI, Gay-Escoda C. In vivo low-density bone apposition on different implant surface materials. International journal of oral and maxillofacial surgery. 2009;38(3):274-8.

Bryington M, Mendonca G, Nares S, Cooper LF. Osteoblastic and cytokine gene expression of implant-adherent cells in humans. Clinical oral implants research. 2014;25(1):52-8.

Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP, et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. Journal of biomedical materials research. 1999;45(2):75-83.

Cattaneo V, Cetta G, Rota C, Vezzoni F, Rota MT, Gallanti A, et al. Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. Journal of periodontology. 2000;71(3):425-32.

Cendon-Filha SP. Efisema Pulmonar: modelo experimental em ratos expostos à fumaça do cigarro. Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo1993.

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. Journal of periodontology. 2003;74(10):1454-9.

Chambrone L, Chambrone LA, Lima LA. Effects of occlusal overload on peri-implant tissue health: a systematic review of animal-model studies. Journal of periodontology. 2010;81(10):1367-78.

Cheng B, Niu Q, Cui Y, Jiang W, Zhao Y, Kong L. Effects of different hierarchical hybrid micro/nanostructure surfaces on implant osseointegration. Clin Implant Dent Relat Res. 2017;19:539–548.

Correa MG, Campos MLG, César-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 Impl. 2009;20:588–593.

Cyprus GN, Overlin JW, Hotchkiss KM, Kandalam S, Olivares-Navarrete. Cigarette smoke increases pro-inflammatory markers and inhibits osteogenic differentiation in experimental exposure model. Acta Biomaterialia. 2018; 76:308-318.

De la Rosa M, Rodriguez A, Sierra K, Mendoza G, Chambrone L. Predictors of peri-implant bone loss during long-term maintenance of patients treated with 10-mm implants and single crown restorations. The International journal of oral & maxillofacial implants. 2013;28(3):798-802.

DeLaurier A, Jackson B, Ingham K, Pfeiffer D, Horton MA, Price JS. Biochemical markers of bone turnover in the domestic cat: relationships with age and feline osteoclastic resorptive lesions. J Nutr 2002; 132(S2):1742S-4S.

de Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. Journal of biomedical materials research Part A. 2007;80(3):554-64.

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.

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. Journal of oral pathology. 1982;11(4):318-26.

Duque A, Martínez PJ, Giraldo A, Gualtero DF, Ardila CM, Contreras A, Duarte S, Lafaurie GI. Accuracy of continine serum test to detect the smoking habit and its association with periodontal disease in a multicenter study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2017; 22(4):425-31.

Ebersole JL, Steffen MJ, Thomas MV, Al-Sabbagh M. Smoking related cotinine levels and host responses in chronic periodontitis. J Periodontol Res 2014;49(5):642-651.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. European journal of oral sciences. 1998;106(3):721-64.

Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. J Bone Miner Res. 1992;7:235-246.

Franck FC, Benatti BB, Andia DC, Cirano FR, Casarin RC, Corrêa MG, Ribeiro FV. Impact of resveratrol on bone repair in rats exposed to cigarette smoke inhalation: histomorphometric and bone-releated gene expression analysis. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2018; 47:541-48.

Fu Q, Bellare A, Cui Y, Cheng B, Xu S, Kong L. The Effect of Hierarchical Micro/Nanotextured Titanium Implants on Osseointegration Immediately After Tooth Extraction in Beagle Dogs. Clinical Implant Dentistry and Related Research. 2017; 19(3):486-495.

Giorgett APO, César Neto JB, Ruiz KGS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Jr. FH. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 110:447-452.

Gonzalez-Garcia R, Monje F. The reliability of cone-beam computed tomography to assess bone density at dental implant recipient sites: a histomorphometric analysis by micro-CT. Clinical oral implants research. 2013;24(8):871-9.

Haas R, Haimbock W, Mailath G, Watzek G. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. The Journal of prosthetic dentistry. 1996;76(6):592-6.

Harris H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don`t know. Clin Chim Acta 1990; 186:133-50.

Heinegard D, Hultenby K, Oldberg A, Reinholt F, Wendel M: Macromolecules in bone matrix. Connect Tissue Res. 1989; 21:3–11.

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;28:3469-3477.

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.

Jimbo R, Xue Y, Hayashi M, Schwartz-Filho HO, Andersson M, Mustafa K, et al. Genetic responses to nanostructured calcium-phosphate-coated implants. Journal of dental research. 2011;90(12):1422-7.

Johansson CB, Gretzer C, Jimbo R, Mattisson I, Ahlberg E. Enhanced implant integration with hierarchically structured implants: a pilot study in rabbits. Clinical oral implants research. 2012;23(8):943-53.

Johansson P, Barkarmo S, Hawthan M, Peruzzi N, Kjellin P, Wennerberg A. Biomechanical, histological, and computed X-ray tomographic analyses of hydroxyapatite coated PEEK implants in an extended healing model in rabbit. J Biomed Mater Res Part A. 2018:106A:1440–7.

Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Bragger U, Hammerle CH, Lang NP. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. Clinical oral implants research. 2003;14(3):329-39.

Khosla S. 2001. Minireview: The opg/rankl/rank system. Endocrinology. 142(12):5050-5055.

Komori T, Kishimoto T. 1998. Cbfa1 in bone development. Curr Opin Genet Dev. 8(4):494-499.

Kotsovilis S, Karoussis IK, Fourmousis I. A comprehensive and critical review of dental implant placement in diabetic animals and patients. Clinical oral implants research. 2006;17(5):587-99.

Lang NP, Zitzmann NU, Working Group 3 of the VEWoP. Clinical research in implant dentistry: evaluation of implant-supported restorations, aesthetic and patient-reported outcomes. Journal of clinical periodontology. 2012;39 Suppl 12:133-8.

Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials. 2007;23(7):844-54.

Le Guehennec L, Goyenvalle E, Lopez-Heredia MA, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Histomorphometric analysis of the osseointegration of four different implant surfaces in the femoral epiphyses of rabbits. Clinical oral implants research. 2008;19(11):1103-10.

Lemesurier SM, Stewart BW, Lykke AWJ. Injury to Type-2 Pneumocytes in Rats Exposed to Cigarette-Smoke. Environ Res. 1981;24(1):207-17.

Lemons J, Dietsch-Misch F. Biomaterials for dental implants. In: Misch CE (ed). Contemporary Implant Denstistry. St Louis:Mosby 1999:271–302.

Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Hassan MQ, Gaur T, Lengner CJ, Young DW. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. Rev Endocr Metab Disord.2006:7(1-2):1-16.

Liu Y, de Groot K, Hunziker EB. Osteoinductive implants: The mise-en-scene for drugbearing biomimetic coatings. Ann Biomed Eng 2004(32)398–406.

Malas M, van der Tempel J, Schwartz R, Minichiello A, Lightfoot C, Noormohamed A, Andrews J, Zawertailo L, Ferrence R. Electronic Cigarettes for Smoking Cessation: A Systematic Review. Nicotine Tob Res. 2016;18(10):1926-36.

Martin-Badosa E, Amblard D, Nuzzo S, Elmoutaouakkil A, Vico L, Peyrin F. Excised bone structures in mice: imaging at three-dimensional synchrotron radiation micro CT. Radiology. 2003;229(3):921-8.

Meirelles L, Arvidsson A, Andersson M, Kjellin P, Albrektsson T, Wennerberg A. Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. Journal of biomedical materials research Part A. 2008;87(2):299-307.

Mendonça G, Mendonça DB, Aragao FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. Biomaterials. 2008;29(28):3822-35.

Mendonça G, Mendonça DB, Simoes LG, Araujo AL, Leite ER, Duarte WR, et al. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. Biomaterials. 2009;30(25):4053-62.

Misch CE, Wang HL, Misch CM, Sharawy M, Lemons J, Judy KW. Rationale for the application of immediate load in implant dentistry: part II. Implant dentistry. 2004;13(4):310-21.

Molon RS, Avila ED, Nogueira AVB, Souza JAC, Avila-Campos MJ, Andrade CR, Cirelli JA. Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. J Periodontol 2014;85:465-477.

Mosely LH, Finseth F. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. Hand. 1977;9(2):97-101.

Nociti Jr. FH, Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP, Sallum EA. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown. J Periosontal Res. 2001; 36(6):361-66.

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. The International journal of oral & maxillofacial implants. 2002;17(3):347-52.

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. Journal of periodontology. 2002;73(9):982-7.

Nune KC, Misra RDK, Gai X, Li SJ, Hao YL. Surface nanotopography-induced favorable modulation of bioactivity and osteoconductive potential of anodized 3D printed Ti-6Al-4V alloy mesh structure. Journal of Biomaterials Applications. 2018; 32(8):1032–48.

Okamoto H: Osteopontin and cardiovascular system. Mol Cell Biochem. 2007; 300:1-7.

Oliveira PGFP. Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica. Estudo in vivo em ratos. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

Park YS, Yi KY, Lee IS, Han CH, Jung YC. The efects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the gritblasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. Int J Oral Maxillofac Implants 2005(20):31–38.

Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C, Jr., Doll R. Mortality from smoking worldwide. British medical bulletin. 1996;52(1):12-21.

Pjetursson BE, Tan K, Lang NP, Bragger U, Egger M, Zwahlen M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. Clinical oral implants research. 2004;15(6):667-76.

Prado FAAA, Jaime APG, Lima AP, Balducci I, Rocha RF. . Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. Rev Odont da USP. 2006(18):7-13.

Reus WF, Robson MC, Zachary L, Heggers JP. Acute effects of tobacco smoking on blood flow in the cutaneous micro-circulation. British journal of plastic surgery. 1984;37(2):213-5.

Rouabhia M, Alanazi H, Park HJ, Gonçalves RB. Cigarette Smoke and E-Cigarette Vapor Dysregulate Osteoblast Interaction with Titanium Dental Implant Surface. Journal of Oral Implantology. 2018; 2-44.

Saito Y, Sato S, Oginuma T, Saito Y, Arai Y, Ito K. Effects of nicotine on guided bone augmentation in rat calvarium. Clinical oral implants research. 2013;24(5):531-5.

Sanchez-Perez A, Moya-Villaescusa MJ, Caffesse RG. Tobacco as a risk factor for survival of dental implants. Journal of periodontology. 2007;78(2):351-9.

Sarve H, Lindblad J, Borgefors G, Johansson CB. Extracting 3d information on bone remodeling in the proximity of titanium implants in srmuct image volumes. Comput Methods Programs Biomed. 2011;102(1):25-34.

Scatena M, Liaw L, Giachelli CM: Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27:2302-09.

Schlegel KA, Prechtl C, Most T, Seidl C, Lutz R, von Wilmowsky C. Osseointegration of slactive implants in diabetic pigs. Clin Oral Implants Res. 2013;24(2):128-134.

Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen JA, Creugers NH. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. Journal of dental research. 2006;85(6):496-500.

Sherwin MA, Gastwirth CM. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. The Journal of foot surgery. 1990;29(1):84-7.

Stefani CM, Nogueira Filho GR, Sallum EA, Toledo S, Sallum AW, Nociti Jr FH. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. J Periodontol. 2002(73):206-12.

Slyfield CR, Tkachenko EV, Wilson DL, Hernandez CJ. Three-Dimensional Dynamic Bone Histomorphometry. Journal of Bone and Mineral Research. 2012; 27(2): 486–495.

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. Journal of clinical periodontology. 2007;34(6):523-44.

Svanborg LM, Andersson M, Wennerberg A. Surface characterization of commercial oral implants on the nanometer level. Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials. 2010;92(2):462-9.

Su Y, Komasa S, Li P, Nishizaki M, Chen L, Terada C, Yoshimine S, Ishizaki H, Okazaki J. Synergistic effect of nanotopography and bioactive ions on peri-implant bone response. International Journal of Nanomedicine. 2017;12: 925-934.

Takeuchi Y, Nagasawa T, Katagiri S, Kitagawara S, Kobayashi H, Koyanagi T, Izumi Y. Salivary levels of antibacterial peptide (LL-37/hCAP-18) and cotinine in patients with chronic periodontitis. J Periodontol. 2012(83):766-72.

Tanaka K, Matsuse R, Miyake Y, Hanioka T, Arakawa M. Salivary cotinine concentrations and prevalence of periodontal disease in young japanese women: the Kyushu Okinawa maternal and child health study. J Periodontol. 2013(84):1724-29.

Tonetti MS. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology. 1998;3(1):88-101.

Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. Clinical oral implants research. 2009;20 Suppl 4:172-84.

Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. The International journal of oral & maxillofacial implants. 2010;25(1):63-74.

Yonezawa T, Lee JW, Hibino A, Asai M, Hojo H, Cha BY, et al.. Harmine promotes osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein signaling. Biochem Biophys Res Commun. 2011;409:260-65.

Yuan X, Kang Y, Zuo J, Xie Y, Ma L, Ren X, Bian Z, Wei Qiuping, Zhou K, Yu Z. Micro/nano hierarchical structured titanium treated by NH4OH/H2O2 for enhancing cell response. PLoS ONE. 2018;13(5): e0196366.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196366

8. Anexo

Anexo 1. Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICATE CEUA – FORP/USP

We hereby certify that the project entitled "Evaluation of a new hydroxiapatite covered nanometric implant surface. An in vitro study in rats exposed to cigarette smoke, as a deficient bone model." Protocol 2015.1.910.58.5 under the responsibility of Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza – involving the production, maintenance and/or use of animals from the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for purposes of scientific research (or teaching) – is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8th, 2008, Decree No. 6899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Board of Animal Experimentation Control (CONÇEA), with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 16/12/2015.

Duration of the Project	16/12/2015 - 16/12/2017
Species/Lineage	Heterogenic rats / Wistar
Nº of animals	96
Weight / age	200-250 g / 7 weeks-old
Gender	Male
Origin	Central Animal Research Facilities of Campus Ribeirão Preto – University of São Paulo

Ribeirão Preto, December 16th, 2015.

Prof. Dr. Michel Reis Messora Vice-Coordenador da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP