UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de CTBMF e Periodontia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

PAULA GABRIELA FACIOLA PESSÔA DE OLIVIERA

**Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita
em escala nanométrica. Estudo *in vivo* em ratos**

PG.PERIO
FORP-USP

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

PAULA GABRIELA FACIOLA PESSÔA DE OLIVIERA

**Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita
em escala nanométrica. Estudo *in vivo* em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em
Odontologia (Periodontia).

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2018**

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.

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Oliveira, Paula Gabriela Faciola Pessoa de

Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica. Estudo *in vivo* em ratos. Ribeirão Preto, 2018.

163 f. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ USP. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Souza, Sérgio Luís Scombatti de

1. Diabetes Mellitus. 2. Implantes Dentários. 3. Expressão Gênica.
4. Microtomografia por Raio-X. 5. Histologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

OLIVEIRA, Paula Gabriela Faciola Pessoa de

Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica. Estudo *in vivo* em ratos.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutora em Odontologia
(Periodontia).

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Pesquisa realizada nos Laboratórios de Biologia Molecular, Histologia, LAB 3D BIO, e Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, e no laboratório de Biomateriais da Universidade de Nova York, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos grandes amores
da minha vida: Sívia, Paulo, Adelina,
Philippe, Alann, Bernardo e Théo. Sem
vocês, nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

A materialização desse sonho só foi possível porque Deus colocou no meu caminho pessoas incríveis, que me encheram de amor e sem as quais eu nada seria. A vocês o meu eterno agradecimento.

Agradeço a **Deus** por todas as oportunidades.

A **Nossa Senhora de Nazaré**, minha fonte inesgotável de fé.

Aos meus pais **Paulo** e **Sílvia**, pelo sacrifício que jamais poderei retribuir. Mesmo ausentes fisicamente, estiveram do meu lado em cada momento dessa trajetória, acreditando em mim e me ajudando a alcançar todos os meus objetivos. Vocês são os grandes responsáveis por mais essa conquista.

Aos meus irmãos **Adelina** e **Philippe**, que mesmo inconscientemente sempre me incentivaram. Pelo amor, amizade, e apoio depositados. Sem vocês, o sonho não seria possível.

Ao meu grande amor **Alann Thaffarell**, meu parceiro da vida e porto seguro. Obrigada por estar presente em todos os momentos dessa caminhada e ser a paz do meu coração. Sua presença torna meus dias mais felizes e cheios de vida.

Ao **Bernardo**, meu presente da vida, amor mais lindo do meu coração. Ser sua madrinha é a maior alegria que eu poderia ter. Agradeço aos amigos **Juliana** e **Diogo** pela amizade verdadeira e por serem os grandes responsáveis por tamanha felicidade.

Aos meus avós, **Léa** e **Herminio**, **Joana** e **Alberto**, os melhores do mundo, fonte de muita inspiração.

Um agradecimento mais do que especial ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. **Sérgio Luís Scombatti de Souza**. Você exerce como ninguém a arte de ensinar. Suas palavras de estímulo, atenção e disponibilidade foram indispensáveis para a realização desse e muitos outros sonhos. Não hesito em afirmar que você foi o maior incentivador e referência que tive durante a vida acadêmica. É um orgulho enorme ter sido sua aluna. Serei eternamente grata.

Ao prof. Dr. **Paulo Guilherme Coelho** por todas as oportunidades oferecidas, por acreditar no meu potencial e pela excelente convivência no período em que estive em Nova York. Agradeço também ao **Lukasz Witek** pela amizade, paciência e ensinamentos.

Aos professores do programa de pós graduação em Periodontia da FORP – USP: Prof. Dr. **Arthur Belém Novaes Júnior**, pela oportunidade de participar do programa e pelos conhecimentos transmitidos; prof. Dr. **Mário Taba Júnior** pelo agradável convívio, pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação; Profa. Dra. **Daniela Bazan Palioto**, pela sua atenção, dedicação, orientação e incentivo e ao prof. Dr. **Michel Reis Messor** pelo incentivo, convivência e por tantos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos de turma: **Nicolly Frota, André Moreira, Tulio Pignaton, Felipe Santos, Kelly Roccio, Umberto Ramos, Gustavo Vieira, Carolina Delmondes, Carolina Mandeta**, por todo companheirismo, cumplicidade e carinho compartilhados durante toda essa jornada. E em especial as minhas grandes amigas irmãs **Cristine Borges e Mariana Sales**. Obrigada por serem tão especiais, por tornarem os meus dias mais felizes e por contribuírem de forma ímpar para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amores de Nova York e da vida: **Edmara, Nathália, Ilana e Marina**, por compartilharem comigo a melhor experiência desse mundo.

Aos queridos **Fabiola, Adriana, Milla, Roger e Sebastião**, presenças fundamentais para a realização desse trabalho. Obrigada pela amizade, paciência, pelo excelente convívio e pelos diversos ensinamentos.

A **SIN implantes** pela doação dos materiais necessários para a realização dessa pesquisa. E em especial ao **Fábio Bezerra e Bruna Ghiraldini**.

Aos funcionários do biotério: **Aline, Massaro, Serginho, Rafael e Marmita**, pessoas incríveis que tive o prazer de conviver.

A minha amada professora **Ana Lúcia Pompeia Fraga de Almeida**. Suas palavras de estímulo e sua mão amiga me ajudaram a superar os obstáculos e a nunca desistir dos meus sonhos. Jamais esquecerei tudo que você fez por mim.

Ao professor **Márcio Matheus Beloti**, pelas palavras de motivação e incentivo e por ter se tornado um grande amigo.

Aos eternos mestres: **Antônio Athayde, Adriano Corrêa, Sílvio Menezes, Tânia Rodrigues, Ana Lúcia Almeida, José Carlos Bastos, Luis Esper, Sueli Devides e Flávio Amado**.

A todos os funcionários da FORP, por todo carinho e boa vontade, especialmente **Tatiana, Dulce, Daniela, Carla Daniela, Suely, Dona Laura, Joana e Regiane**.

Ao amigo **Armando Lopes Pereira**, um grande exemplo de profissional. Obrigada por tantas oportunidades e ensinamentos.

A tão querida **Adriana Silveira e Souza** por tantos gestos de carinho a mim dedicados.

À Tia **Bela**, minha madrinha-mãe, meu amor incondicional. Obrigada pelo simples fato de ser você e de me amar como uma filha.

A eles que foram a família que eu pude escolher em Ribeirão Preto: **Adriana, Alexandre e Dilaina Santos**. Obrigada pelo amor sincero e verdadeiro, pelo carinho e pela amizade.

Aos amados **Tio Rui e Tia Lene** por se fazerem sempre presentes, me apoiando e me enchendo de amor.

A **Roberta Freitas e Anabela**, sempre tão presentes, meu eterno agradecimento por dividirem comigo as melhores risadas e principalmente o seu amor.

Ao **Marcus Viana**, o irmão que a vida me deu e que está comigo em absolutamente todos os momentos. Sem dúvidas és o meu anjo da guarda na terra.

A **Renata Mendonça**, meu porto seguro, pela torcida de sempre e amor incondicional.

A **Irema**, que mesmo tão longe sempre se fez presente, trazendo mais alegria para a minha vida.

A minha **família maravilhosa** e aos tantos **amigos** espalhados pelo mundo, agradeço por toda cumplicidade e amor que me concederam nessa trajetória, me fazendo uma pessoa mais feliz.

Agradeço também, a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (CNPQ)**, pelo apoio financeiro essencial para a execução deste trabalho.

Ao **Centro Universitário do Pará**.

Ao **Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (Centrinho)**.

Ao laboratório de **Biomateriais da Universidade de Nova York**.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto**.

RESUMO

OLIVEIRA, P. G. F. P. **Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica. Estudo in vivo em ratos.** Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2018. 163p.

A terapia com implantes têm sido uma alternativa previsível para substituir ausências dentárias parciais ou totais. No entanto, influências sistêmicas, tal como o diabetes mellitus (DM), podem influenciar negativamente nesse processo. Modificações na microtopografia e superfície dos implantes são estratégias usadas para promover uma melhor ancoragem óssea. Assim, levando em consideração o desenvolvimento de novas superfícies de implantes visando à melhora qualitativa e quantitativa do fenômeno de osseointegração, e por outro lado a deficiência cicatricial dos portadores de DM, os quais podem ser utilizados como modelos de indivíduos com reparo ósseo deficiente, o objetivo desse projeto foi realizar um estudo *in vivo*, compreendendo ratos saudáveis e ratos diabéticos, para avaliar a resposta biológica uma nova superfície de implante, modificada pela adição de nano-hidroxiapatita, por meio de análises microtomográfica: contato tridimensional osso implante (IS/TS, %), relação entre volume ósseo e superfície óssea (BV/TV, %), relação entre superfície óssea e volume ósseo (BS/BV, mm), separação trabecular (Tb.Sp, %) e porosidade total (Po.To, %); histomorfométrica: avaliação do contato osso-implante (BIC, %) e da densidade óssea ao redor dos implantes (BAFO, %); nanomecânica: módulo de elasticidade (ME) e dureza (D); de expressão gênica: fator de transcrição “runt-related” 2 (Runx2), fosfatase alcalina (Alp), osteocalcina (Oc), osteopontina (Opn), receptor ativador de fator nuclear kappa-B (Rank), receptor ativador do fator nuclear kappa ligante (Rankl) e osteoprotegerina (Opg). Para isso, mini implantes (superfície LISA, duplo ataque ácido (DAA) e com adição de nano-hidroxiapatita (NANO)) foram instalados nas tíbias de ratos saudáveis (n=36) e diabéticos (n=36). Os animais foram eutanasiados aos 7 e 30 dias após a instalação dos implantes. As tíbias direitas foram removidas e fixadas para análise tri-dimensional, histológica e nanomecânica e as esquerdas para avaliação da expressão gênica. Os dados foram avaliados através da análise de variância + teste de Tukey e foram apresentados em função da média e intervalo de confiança de 95%. A % IS/TS mostrou que o revestimento com NANO HA apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado as superfícies LISA e DAA, independentemente do tempo e da condição sistêmica. BV/TV (%), BS/BV (mm) e Po.To (%) demonstraram valores mais elevados para o grupo NANO em todos os tempos avaliados e independentemente da condição sistêmica quando comparado aos outros grupos experimentais, com exceção do BS/BV (30 dias rato saudável e 7 e 30 dias rato diabético). Já os resultados da Tb.Sp (%) revelaram diferenças estatísticas favorecendo o grupo diabético

NANO aos 7 e 30 dias. A partir da análise histomorfométrica, a superfície NANO apresentou maiores % BIC e % BAFO quando comparados com LISA e DAA (dados avaliados em função da superfície do implante). Além disso, a superfície NANO apresentou maiores % BIC e % BAFO do que a LISA e DAA, com diferenças estatisticamente significantes (avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante). A superfície NANO apresentou maiores valores de ME e D quando comparado as superfícies LISA e DAA, com diferenças estatisticamente significantes (avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), a expressão relativa de Rank evidenciou que a superfície NANO apresentou os melhores resultados aos 7 dias (rato diabético). Adicionalmente, os níveis de Runx2, Alp, Oc e Opn sugerem um aumento da proliferação de osteoblastos, principalmente nos estágios iniciais da osseointegração. A partir dos resultados encontrados, podemos concluir que os implantes recobertos com NANO-hidroxiapatita apresentaram resultados promissores em promover formação de novo osso em um modelo de cicatrização deficiente.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus, implantes dentários, expressão gênica, microtomografia por raio-X, histologia.

ABSTRACT

OLIVEIRA, P. G. F. P. **Evaluation of a new hydroxiapatite covered nanometric implant surface. An *in vivo* study in rats.** Thesis (Doctor). School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. 163 p.

Implant therapy has been a predictable alternative to replace partially or totally missing teeth. However, systemic disease such as diabetes mellitus (DM) may negatively influence the osseointegration. Changes in microtopography and implant surface are two strategies used to promote better bone anchorage. Thus, taking into account the development of new implant surface to improve qualitative and quantitative osseointegration, and on the other hand the impaired healing of DM, which can be used as models of subjects with impaired bone repair. The aim of this *in vivo* study was to evaluate the biologic response of a new implant surface, modified by the addition of nano-hydroxyapatite through three-dimensional (3D) evaluation using micro-CT: percent intersection surface (IS/TS, %), percent bone volume (BV/TV, %), bone surface/volume ratio (BS/BV, mm), trabecular separation (Tb.Sp, %) and total porosity (To.Po, %); histological analysis: bone to implant contact (BIC, %) and bone area fraction occupancy (BAFO, %); nanomechanical properties: elastic modulus (EM) and hardness (H) and gene expression analysis: runt-related transcription factor 2 (Runx2), alkaline phosphatase (Alp), osteocalcin (Oc), osteopontin (Opn), receptor activator of nuclear factor-kappa B (Rank), receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (Rank-L) and osteoprotegerin (Opg). Mini implants (machined, double acid etched and with addition of nano-hydroxyapatite) were installed in tibias of healthy rats (n=36) and diabetic rats (n=36). The animals were euthanized at 7 and 30 days. The right tibia were removed and fixed for micro-CT, histological and nanomechanical analysis and the left for evaluation of gene expression. Data were assessed through analysis of variance + Tukey test and are presented as a function of mean and 95% confidence interval. The % IS/TS showed that NANO group presented statistically significant difference when compared to machined and DAE, regardless of time and systemic condition. BV/TV (%), BS/BV (mm) and To.Po (%) demonstrated higher values for NANO group in all evaluated time point and irrespective of systemic condition, but BS/BV 30 days (healthy rat) and 7 and 30 days (diabetic rat). The results of Tb.Sp (%) revealed statistical differences for NANO diabetic group at 7 and 30 days. From the histomorphometric analysis, NANO surface presented higher % BIC and % BAFO when compared to machined and DAE (data evaluated as a function of implant surface). Additionally, NANO surface presented higher % BIC and % BAFO than machined and DAE, with statistically significant differences (data as a function of time and implant surface). NANO surface depicted higher EM and H values when compared to machined and DAE surfaces, with statistically significant differences (data as a function of time and implant

surface). Evaluating all factors (time, systemic condition and surface treatment), the relative expression of Rank showed that NANO surface presented the best results at 7 days (diabetic rats). Furthermore the levels of Runx2, Alp, Oc and Opn suggest an increase in osteoblasts proliferation, especially in early stages of osseointegration. Nano-hydroxyapatite coated implants presented promising results and can be considered an important tool to compensate impaired bone healing reported in diabetics.

Keywords: Diabetes Mellitus, dental implants, gene expression, microtomography, histology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Verificação do estado hiperglicêmico	32
Figura 2. Cirurgia para instalação dos implantes	33
Figura 3. Macroestrutura do implante	34
Figura 4. Remoção e preparo do material para posterior análise tridimensional por micro-CT, processamento histológico/análise histomorfométrica e teste de nanoindentação	36
Figura 5. Remoção e preparo do material para posterior avaliação da expressão gênica	36
Figura 6. Desenho demonstrativo do local das medições de BIC e BAFO	38
Figura 7. Valores de glicemia (mg/dL) dos grupos saudável e diabético no momento da instalação dos implantes e no dia da eutanásia.....	44
Figura 8. Reconstrução das imagens em 3D	45
Figura 9. Gráficos representando % IS/TS ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).....	47
Figura 10. Gráfico representando a % IS/TS quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)..	48
Figura 11. Gráficos representando % BV/TV ao redor do implante, organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).....	49
Figura 12. Gráfico representando a % BV/TV quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)..	50
Figura 13. Gráficos representando BS/BV ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).....	51
Figura 14. Gráfico representando BS/BV quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)	52
Figura 15. Gráficos representando Tb.Sp ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).....	53
Figura 16. Gráfico representando Tb.Sp quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)	54
Figura 17. Gráficos representando % Po.To ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).....	55
Figura 18. Gráfico representando % Po.To quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)	56
Figura 19. Imagens histológicas coradas com Stevenel's blue e Vermelho de Alizarina de todos os grupos experimentais.....	57

Figura 20. Gráficos representando a % BIC organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%)	59
Figura 21. Gráfico representando a % BIC quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)	60
Figura 22. Gráficos representando a %BAFO ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%)	61
Figura 23. Gráfico representando a % BAFO ao redor do implante quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%).....	62
Figura 24. Imagens representativas das áreas aonde foram realizados os ensaios de nanoindentação de todos os grupos experimentais.....	63
Figura 25. Gráficos representando o ME ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%)	65
Figura 26. Gráfico representando o ME ao redor do implante quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%).....	66
Figura 27. Gráficos representando D ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).....	67
Figura 28. Gráfico representando a D ao redor do implante quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%).....	68
Figura 29. Expressão relativa de Runx2 com dados organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).....	69
Figura 30. Expressão relativa de Runx2 quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)	70
Figura 31. Expressão relativa de Alp com dados organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).....	71
Figura 32. Expressão relativa de Alp quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)	72
Figura 33. Expressão relativa de Oc organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%)	73
Figura 34. Expressão relativa de Oc quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)	74
Figura 35. Expressão relativa de Opn com dados organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).....	75

Figura 36. Expressão relativa de Opn quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)	76
Figura 37. Expressão relativa de Rank com dados organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).....	77
Figura 38. Expressão relativa de Rank quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)	78
Figura 39. Expressão relativa de Rankl com dados organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).....	79
Figura 40. Expressão relativa de Rankl quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)	80
Figura 41. Expressão relativa de Opg organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%)	81
Figura 42. Expressão relativa de Opg quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%)	82

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

·	Graus
°C	Graus Celsius
%	Porcento
>	Maior
<	Menor
=	Igual
3D	Tridimensional
A	Área de contato
AGE	Produtos finais de glicação avançada
Alp	Fosfatase alcalina
BAFO	Densidade óssea ao redor do implante
BIC	Contato osso implante
BS/BV	Relação entre superfície óssea e volume ósseo
BV/TV	Relação entre volume ósseo e superfície óssea
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
cm	Centimetro
Ct	Cicle threshold
D	Dureza
DAA	Duplo ataque ácido
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Ei	Módulo elástico para o penetrador
FORP-USP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
g	Gramma
Gapdh	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPa	Gigapascal

hc	Profundidade de contato
IC	Intervalo de confiança
IS/TS	Contato tridimensional osso implante
Kg	Kilograma
KV	Kilovoltagem
M	Concentração molar
ME	Módulo de elasticidade
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mg/dL	Miligramas por decilitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
μA	Microampere
μg	Micrograma
μL	Micro litro
μm	Micrometro
μN	Micronewton
n	Número de animais
NANO	Nanométrica
NANO HA	Nano-hidroxiapatita
Nm	Nanômetros
Oc	Osteocalcina
Opn	Osteopontina
Opg	Osteoprotegerina
p	Probabilidade de significância
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
P max	Força máxima

Po.To	Porosidade total
RAGE	Receptor para produtos finais de glicação avançada
Rank	Receptor ativador de fator nuclear kappa-B
Rankl	Receptor ativador do fator nuclear kappa ligante
RIN	Ácido ribonucleico integrity number
RNA	Ácido ribonucleico
ROI	Região de interesse
RPM	Rotação por minuto
Runx2	Fator de transcrição “runt-related” 2
S	Rigidez
SD	Saudável
Seg	Segundos
STZ	Streptozotocina
Tb.Sp	Separação trabecular
UI	Unidade internacional de medida
vb	Coeficiente de Poisson para o osso cortical
vi	Coeficiente de Poisson para penetrador
VOI	Volume de interesse

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Animais.....	31
3.2 Indução do Diabetes Mellitus	31
3.3 Procedimentos Cirúrgicos	32
3.4 Grupos experimentais	34
3.5 Análise microtomográfica	37
3.6 Processamento e análise histológica.....	37
3.7 Teste mecânico de nanoindentação	38
3.8 Avaliação da expressão gênica	40
3.8.1 Extração de RNA (ácido ribonucleico) total	40
3.8.2 Síntese da fita de DNA (ácido desoxirribonucleico) complementar	41
3.8.3 Reação de PCR em tempo real utilizando o sistema de sondas Taqman	41
3.9 Análise Estatística	42
4 RESULTADOS	44
4.1 Resultados Microtomográficos.....	44
4.1.1 Contato tridimensional osso implante (IS/TS)	46
4.1.2 Densidade óssea tridimensional (BV/TV).....	48
4.1.3 Relação da superfície óssea pelo volume ósseo (BS/BV)	50
4.1.4 Separação Trabecular (Tb.Sp)	52
4.1.5 Porcentagem porosidade total (Po.To)	54
4.2 Resultados Histomorfométricos:	56
4.2.1 Contato osso implante (BIC)	58
4.2.2 Densidade óssea ao redor do implante (BAFO)	60
4.3 Resultados de nanoindentação:.....	63
4.3.1 Módulo de elasticidade (ME)	64
4.3.2 Dureza (D)	66
4.4 Resultados de expressão gênica:.....	68
4.4.1 Fator de transcrição “runt-related” 2 (Runx2).....	68

4.4.2 Fosfatase alcalina (Alp)	70
4.4.3 Osteocalcina (Oc)	72
4.4.4 Osteopontina (Opn)	74
4.4.5 Receptor ativador de fator nuclear kappa-B (Rank)	76
4.4.6 Receptor ativador do fator nuclear kappa ligante (Rankl).....	78
4.4.7 Osteoprotegerina (Opg)	80
 5 DISCUSSÃO	84
 6 CONCLUSÃO.....	90
 7 REFERÊNCIAS	92
 ANEXO.....	105
 ARTIGOS.....	106
<i>Artigo 1</i>	<i>107</i>
<i>Artigo 2</i>	<i>135</i>

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Em 1969, Branemark e colaboradores definiram a osseointegração como o contato direto entre o osso vivo e um implante em função, sem interposição de qualquer outro tecido (Branemark et al. 1969). De acordo com Albrektson et al., em 1981, alguns requisitos são decisivos para alcançar a osseointegração, incluindo a biocompatibilidade do material, técnica cirúrgica, design do implante, condições de carga após a instalação, qualidade da superfície e a região de instalação (Albrektsson et al. 1981). A terapia com implantes têm sido uma alternativa promissora para substituir ausências dentárias parciais ou totais (Adell et al. 1990; Jemt and Lekholm 1993; Jemt et al. 1989). No entanto, fatores como o tabagismo (Chambrone et al. 2014; De la Rosa et al. 2013; Strietzel et al. 2007), relação entre a restauração final e os dentes adjacentes (Lang et al. 2012), distribuição das cargas oclusais (Chambrone et al. 2010; Pjetursson et al. 2004), a saúde dos tecidos ósseo e mole ao redor dos implantes (De la Rosa et al. 2013; Esposito et al. 2007; Pjetursson et al. 2004), e alterações sistêmicas como o diabetes mellitus (DM) (Ajami et al. 2016; Giglio et al. 2000; He et al. 2004; King et al. 2016) podem influenciar no sucesso do tratamento.

O DM se apresenta como um dos maiores problemas de saúde do mundo (King et al. 1998). É definido como desordem metabólica caracterizada pela hiperglicemia proveniente de anormalidades na secreção ou resposta das células à insulina, que é um hormônio produzido pelas células beta nas ilhotas pancreáticas de Langerhans (Expert Committee on the and Classification of Diabetes 2000). Pode ser dividido em diabetes tipo 1 e tipo 2. O DM tipo 1 é uma doença auto-imune associada à destruição das células beta pancreáticas e, portanto, requer insulinoterapia, enquanto que o DM tipo 2 é caracterizado por uma deficiência relativa e não absoluta de insulina e é geralmente uma doença multifatorial (Retzepi and Donos 2010). Adicionalmente, o DM tem demonstrado aumentar significativamente os níveis de doença periodontal e a perda dentária (Emrich et al. 1991; Oliver and Tervonen 1993; Safkan-Seppala and Ainamo 1992), e tem sido considerado como uma condição de risco para o tratamento com implantes pelo fato de estar associado com uma cicatrização atrasada (Rothwell and Richard 1984), prevalência de doença micro vascular (Frantzis et al. 1971), e resposta prejudicada à infecção (McMahon and Bistran 1995). No entanto, o DM continua sendo uma contra-indicação relativa para a terapia com implantes (Michaeli et al. 2009), ou seja, pacientes diabéticos bem controlados podem ser considerados apropriados para a terapia, enquanto que pacientes sem um bom controle glicêmico podem ser privados dos benefícios desse tratamento (Oates et al. 2013). A literatura revela que nesse cenário hiperglicêmico, a

formação óssea ao redor dos implantes se apresenta de forma incompleta e atrasada, que o contato osso-implante pode ser prejudicado e que o osso neoformado é imaturo e pobremente organizado (Iyama et al. 1997; Johansson and Albrektsson 1987; Margonar et al. 2003; McCracken et al. 2000; Nevins et al. 1998; Sennerby et al. 1992; Takeshita et al. 1997).

Alguns estudos experimentais em animais demonstraram que o DM pode interferir negativamente no processo de osseointegração, diminuindo a formação óssea durante os eventos de cicatrização (Giglio et al. 2000; Johansson and Albrektsson 1987; Lu et al. 2003; McCracken et al. 2000; Sennerby et al. 1992; Takeshita et al. 1997). A hiperglicemia persistente em indivíduos diabéticos inibe a atividade osteoblástica e altera a resposta do hormônio paratireóideo que regula o metabolismo de cálcio e fósforo (Santana et al. 2003), diminui a formação de colágeno durante a cicatrização (Gooch et al. 2000), induz a apoptose em células de revestimento ósseo (He et al. 2004) e aumenta a atividade osteoclástica devido a uma resposta inflamatória persistente (Kayal et al. 2007). Além disso, também induz um efeito deletério na matriz óssea e diminui o crescimento e o acúmulo de matriz extracelular (Weiss et al. 1981).

Atualmente, o uso de implantes dentários tem sido considerado um procedimento seguro e altamente previsível, com uma taxa de sobrevivência de 94,6% e uma taxa de sucesso de 89,7% após 10 anos (Moraschini et al. 2015). Apesar das altas taxas de sucesso apresentadas, as características dos implantes vêm mudando ao longo dos anos, tendo como objetivos a redução no tempo de tratamento e a melhora no processo de osseointegração em indivíduos que apresentam desordens metabólicas que podem prejudicar a cicatrização óssea (Schlegel et al. 2013). Dessa forma, uma variedade de métodos tem sido utilizada na tentativa de melhorar a cicatrização óssea, incluindo mudanças no design (Battula et al. 2015; Manna et al. 2018; Sennerby et al. 2015), adição de compostos biológicos (Liu et al. 2004) e alterações na superfície (Ajami et al. 2016; Berglundh et al. 2007; Boyan et al. 1996; Bracer et al. 2009; Buser et al. 2004; Chehroudi et al. 1989; Coelho et al. 2014a; Jimbo et al. 2012a; Klokkevold et al. 1997; Liu et al. 2004; Meirelles et al. 2008; Novaes et al. 2010; Park et al. 2005). A superfície dos implantes é um dos fatores de maior importância, pois é o primeiro componente a interagir com o hospedeiro. Modificações na mesma vêm sendo investigadas na busca de uma melhor cicatrização óssea, objetivando melhorar a qualidade do novo osso formado (Berglundh et al. 2007; Buser et al. 2004; Coelho et al. 2012; Coelho et al. 2014a; Le Guehennec et al. 2007; Novaes et al. 2010; Wennerberg and Albrektsson 2011).

As primeiras reações químicas entre a superfície do implante e os tecidos orgânicos são reguladas pelos fluidos teciduais. Logo em seguida, é formada na superfície do implante

uma camada de macromoléculas glicoproteicas e água, sendo esta determinante como parte do substrato necessário para adesão, proliferação, diferenciação e síntese proteica de células osteoblásticas. Em paralelo ao processo de reparação do tecido ósseo necrótico remanescente no alvéolo cirúrgico preparado, uma série de eventos bioquímicos é desencadeada, tais como alterações no pH tecidual, liberação de proteínas e enzimas reguladoras do processo de divisão e diferenciação celular, dentre elas os fatores de crescimento e citocinas. Logo em seguida, com a presença do tecido de granulação, inicia-se um processo de reparo tecidual por meio do depósito de matriz colágena não-calcificada e consequente formação de matriz fibrosa. Com o aumento gradual da incorporação de componentes inorgânicos à matriz, dá-se início ao modelamento e remodelamento dessa cobertura parcialmente mineralizada em torno do implante (Albrektsson and Johansson 2001; Branemark et al. 1969; Davies 1998; Dinato 2004).

Tanto a morfologia quanto a rugosidade superficial dos implantes exercem uma importante influência na proliferação e diferenciação celular, na síntese da matriz extracelular, na produção de fatores locais, e até mesmo no tipo celular (Anselme and Biggerelle 2005; Elias and Meirelles 2010). Além disso, a forma da célula regula o seu crescimento, a expressão de genes, a secreção de proteínas, a diferenciação e apoptose (Brunette et al. 2001). A aderência dos osteoblastos à superfície dos implantes é necessária para que a célula receba os sinais para induzir a proliferação celular (Elias and Meirelles 2010). A rugosidade, por sua vez, além de facilitar a retenção de células osteogênicas, permite que haja a migração para a superfície do implante através da osseocondução (Braceras et al. 2009), promovendo uma melhor aderência do colágeno e aumentando a área da superfície, resultando em mais sítios para a fixação das células, maior crescimento tecidual e estabilidade mecânica (Wennerberg and Albrektsson 2000; 2009; 2010).

As superfícies de implantes evoluíram de lisas a moderadamente ásperas, com algumas alterações químicas (Albrektsson and Wennerberg 2004a; 2004b). Do ponto de vista da osseointegração precoce, estudos com avaliações histomorfométricas e biomecânicas têm demonstrado uma maior osteocondutividade para as superfícies texturizadas, quando comparado às lisas (Albrektsson and Wennerberg 2004a; 2004b; Berglundh et al. 2007; Buser et al. 2004; Coelho et al. 2011b; Coelho et al. 2014a). Klokkevold et al., em 1997, realizaram um estudo comparativo da resistência do torque de remoção de implantes de titânio com superfície lisa e superfície com duplo ataque ácido (DAA) e concluíram que o DAA tem a propriedade de aumentar significativamente a osseointegração (Klokkevold et al. 1997). Marinho et al., em 2003, realizaram um estudo em coelhos e observaram um melhor contato

osso-implante quando na utilização de superfícies com jateamento e ataque ácido em comparação às superfícies lisas (Marinho et al. 2003).

Nanoestruturas aplicadas a biomateriais têm sido propostas para proporcionar um grau superior de osseointegração (Coelho et al. 2014a; Ellingsen et al. 2004; Jimbo et al. 2012a). Estudos demonstram que a resposta biológica é sensível a diferentes nanoestruturas (Coelho et al. 2011b; Coelho et al. 2014a; Jimbo et al. 2012a; Jimbo et al. 2012b). No ano de 2007, Webster e Ahn concluíram que nanoestruturas menores do que 100 nm são mais eficazes na integração celular (Webster and Ahn 2007). Meirelles et al., em 2008, realizaram um estudo em coelhos e observaram um aumento precoce da formação óssea em implantes modificados com nano-hidroxiapatita (NANO HA) (Meirelles et al. 2008). Os autores afirmaram que esses resultados podem ter resultado da possível bioatividade química da hidroxiapatita ou da topografia das nanoestruturas implementadas. Em outro estudo, abordando a expressão gênica em torno de implantes revestidos com NANO HA foi observado que houve uma melhora significativa na expressão de genes osteogênicos, sugerindo que a NANO HA está ativamente envolvida na formação óssea (Coelho et al. 2014a; Jimbo et al. 2012a; Jimbo et al. 2011; Meirelles et al. 2008; Webster and Ahn 2007).

A formação de um contato direto entre o osso e o implante (BIC) é um parâmetro importante que influencia no sucesso global e na sobrevida da terapia com implantes dentários (Javed et al. 2011; Pinholt 2003; Schulz et al. 2014). A fixação osteoblástica e a síntese de colágeno são significativamente maiores em torno de implantes de superfície áspera, em contraste com implantes com superfícies lisas (Jiang et al. 2015; Marin-Pareja et al. 2014). Jimbo et al., em 2012, avaliaram 20 implantes de titânio, metade preparados com superfície de nanopartículas de hidroxiapatita estável e metade jateada, tratados com ácido e posteriormente, tratados termicamente, os quais foram inseridos em fêmures de coelhos (Jimbo et al. 2012a). Após 3 semanas de cicatrização, as amostras foram preparadas para análise histomorfométrica. As propriedades nanomecânicas do osso circundante foram avaliadas através do teste de nanoindentação. Enquanto ambos os implantes revelaram BIC semelhante, a nanoindentação demonstrou que a qualidade do tecido foi significativamente aumentada em torno dos implantes revestidos com NANO HA. Dessa forma, pode-se sugerir que através da nanoindentação é possível avaliar puramente as propriedades mecânicas do osso em escala reduzida, sem a influência de outros fatores (Coelho et al. 2014a).

Martinez et al., 2018 realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a influência de nanocristais de hidroxiapatita agregados em superfícies NANO sobre o comportamento de células osteoblásticas em comparação a uma superfície convencional com DAA. Para isso,

discos de titânio comercialmente puros foram selecionados e a proliferação e viabilidade celular foram avaliadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A expressão do colágeno tipo I e osteopontina também foram analisados. Os resultados mostraram que as células apresentaram maior espalhamento morfológico na superfície NANO quando comparada com a superfície convencional de DAA em todos os tempos avaliados. Um aumento da proliferação e viabilidade celular foram detectados na superfície NANO, especialmente após 72 horas. A expressão de osteopontina foi maior após 24 horas na superfície de NANO quando comparada DAA. Para o colágeno tipo I, foi observada uma maior expressão na superfície NANO também no tempo de 72 horas ($p < 0,05$). Esse estudo mostrou que a superfície NANO favoreceu os eventos iniciais da osseointegração (Martinez et al. 2018).

Ajami et al., 2014 realizaram dois experimentos paralelos, um modelo de osteotomia e um modelo de câmara de crescimento ósseo (Ajami et al. 2014). O modelo de osteotomia rastreou a cicatrização do osso temporal nos fêmures de ratos euglicêmicos e hiperglicêmicos utilizando análise de micro-tomografia computadorizada (micro-CT) e histologia. O modelo de câmara óssea em crescimento utilizou superfícies de implantes de complexidade micro ou nanotopográfica e mediu o BIC em ambos os grupos metabólicos. Análises quantitativas de micro-CT sobre volume ósseo, número de trabéculas e densidade de conectividade trabecular forneceram evidências claras de que tanto a formação óssea trabecular reparativa quanto a remodelação estavam atrasadas na hiperglicemia, e o volume ósseo reparativo mudou com o tempo entre os grupos metabólicos. Um aumento da probabilidade de osteocondução foi visto no grupo NANO quando comparado à superfície MICRO, independente do grupo metabólico. As superfícies NANO na hiperglicemia superaram superfícies MICRO em animais euglicêmicos. Dessa forma, os autores concluíram que a integração comprometida do implante na hiperglicemia é anulada pela adição de características nanotopográficas a uma superfície subjacente de implantes microtopograficamente complexa (Ajami et al. 2014). Outros estudos concluíram que o osso recém-formado ao redor dos implantes se apresenta de forma imatura e menos organizada em ratos diabéticos não controlados quando comparados a controles não diabéticos, sugerindo diferenças qualitativas no osso neoformado (Giglio et al. 2000; McCracken et al. 2000; Nevins et al. 1998; Takeshita et al. 1997).

A rugosidade da superfície em nanoescala pode ser um fator decisivo para a osteogênese devido ao tamanho das proteínas e dos receptores da membrana celular corresponderem à topografia da superfície nessa escala de comprimento. Gittens et al., em 2011, relataram que modificações em nível nanométrico aumentaram consideravelmente a diferenciação pré-osteoblástica através de níveis significativamente mais altos de expressão

de osteocalcina e osteoprotegerina *in vitro* (Gittens et al. 2011). Meirelles et al., em 2007 realizaram um estudo em animais com implantes contendo nanoestruturas e implantes controles sem mudanças na superfície, e revelaram que implantes com nano estruturas apresentaram maior BIC quando comparado com o controle (Meirelles et al. 2007). Essas informações sugerem que células, particularmente osteoblastos, respondem a alterações topográficas em escala nanométrica. Adicionalmente, a formação reduzida de osteóide, a mineralização osteóide retardada e a redução do volume e maturação óssea global na presença de hiperglicemia foram relatados por Goodman e Hori, 1984 (Goodman and Hori 1984).

As técnicas mais comumente usadas para avaliar a osseointegração em modelos *in vivo* são radiografias, testes mecânicos, histológicos e/ou histomorfométricos (Johansson et al. 2012). Mais recentemente, o micro-CT passou a ser utilizado para avaliação da morfologia e micro-estrutura ósseas, usando dados de projeções de raios-X em vários ângulos para reconstruir uma representação em 3D (tridimensional) do modelo que caracteriza a distribuição da densidade do material, permitindo assim o estudo de estruturas de alguns micrômetros, tais como trabéculas ósseas (Gonzalez-Garcia and Monje 2013; Martin-Badosa et al. 2003). É amplamente usada para analisar a estrutura interna do tecido ósseo devido às suas vantagens de rapidez, reprodutibilidade e não-destrutividade (Feldkamp et al. 1989). Podem ser avaliados por meio da resposta óssea analisada por micro-CT diversos parâmetros experimentais, tais como comprimento, diâmetro, formato, superfície e material do implante, a condensação óssea, o tempo de implantação, o sítio de implantação, a aplicação ou não de carga funcional sobre os implantes analisados e o período de cicatrização antes da aplicação da carga funcional (Gonzalez-Garcia and Monje 2013; Park et al. 2008).

Assim, levando em consideração o desenvolvimento de novas superfícies de implantes com processos visando à melhora qualitativa e quantitativa do fenômeno de osseointegração, e por outro lado a deficiência cicatricial dos portadores de DM, os quais podem ser utilizados como modelos de indivíduos com reparo ósseo deficiente, seria interessante avaliar, em um estudo *in vivo*, em ratos saudáveis e diabéticos (como um modelo de reparo ósseo deficiente) a resposta biológica a uma nova superfície de implante modificada pela adição de NANO HA.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

Avaliar *in vivo*, utilizando ratos diabéticos (como um modelo de reparação óssea deficiente) e ratos saudáveis (controle com reparação óssea normal) uma nova superfície de implantes com nanopartículas de hidroxiapatita (NANO HA), por meio de:

- Análise microtomográfica (micro-CT): avaliação, no osso interno às roscas dos implantes, dos seguintes parâmetros tomográficos: contato tridimensional osso implante (IS/TS, %), relação entre volume ósseo e superfície óssea (BV/TV, %), relação entre superfície óssea e volume ósseo (BS/BV, mm), separação trabecular (Tb.Sp, %) e porosidade total (Po.To, %);
- Análise histomorfométrica: avaliação do contato osso-implante (BIC, %) e da densidade óssea ao redor dos implantes (BAFO, %);
- Análise nanomecânica: módulo de elasticidade (ME) e dureza (D);
- Avaliação da expressão gênica dos seguintes genes marcadores do metabolismo ósseo: fator de transcrição “runt-related” 2 (Runx2), fosfatase alcalina (Alp), osteocalcina (Oc), osteopontina (Opn), receptor ativador de fator nuclear kappa-B (Rank), receptor ativador do fator nuclear kappa ligante (Rankl) e osteoprotegerina (Opg).

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram selecionados 72 ratos adultos machos do tipo Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com peso entre 200 a 250 g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP). Os animais foram mantidos com livre acesso à água e dieta padrão, e mantidos em gaiolas plásticas apropriadas em ambiente com ciclo de 12 horas de luz e temperatura entre 22 e 24°C. Antes dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais permaneceram no biotério por um período de 7 dias para aclimação. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, nos grupos diabetes mellitus (DM) e saudável (SD). O protocolo do estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da FORP-USP (protocolo número: 2014.1.1083.58.4) (Anexo 1).

3.2 Indução do Diabetes Mellitus

O DM foi induzido em 36 animais, escolhidos de acordo com uma tabela numérica aleatória gerada pelo site Randomization.com (<http://www.randomization.com>). Cada um dos animais recebeu um dos seguintes protocolos: administração de estreptozotocina ou administração do tampão citrato. Os mesmos permaneceram em jejum de 12 horas antes do início da indução. A indução foi realizada através da administração de estreptozotocina (STZ) (Sigma Chemical Co, Saint Louis, Missouri, EUA), um agente diabetogênico. A STZ foi administrada em uma única aplicação, via intraperitoneal na dosagem de 60 mg/Kg de peso do animal, dissolvido em 0,2 mL de tampão citrato 0,01 M, pH 4,45. O grupo saudável recebeu apenas o veículo, via intraperitoneal, a um volume de 1 ml/kg (n = 36).

Após 7 dias, foi verificado o nível de glicose circulante para confirmação do estado hiperglicêmico, utilizando o Accu-Chek (Active monitoring system, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Zug, Suíça), segundo as instruções do fabricante (Figura 1A, 1B e 1C). Esse controle glicêmico, tanto no grupo DM quanto no grupo SD foi realizado no dia da instalação dos implantes e no dia da eutanásia através de uma punção superficial na cauda distal. Apenas animais com glicemia acima de 300 mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos no estudo (Margonar et al. 2003). O nível de glicose sanguínea considerado normal para a espécie varia entre 50 a 135 mg/dL (Harkness and Wagner 1993).

Figura 1. Verificação do estado hiperglicêmico. A) Posicionamento inicial. B) Coleta do sangue na tira de papel. C) Verificação realizada em um animal do grupo diabetes mellitus.

3.3 Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram primeiramente pesados para o correto cálculo anestésico. A anestesia geral foi obtida pela administração de uma injeção de 100-130 $\mu\text{L}/100\text{g}$ de peso animal em uma combinação 4:3 de ketamina (74,1 mg/g de cloridrato de ketamina a 10%; Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e xilazina (11,2 mg/kg dopaser; Calier Laboratories S/A, Barcelona, Espanha). Logo em seguida foi realizado a tricotomia da região a ser operada e a antisepsia com solução de iodo a 10% (Rioquímica Ind. Farmacêutica, São Paulo, Brasil).

Subsequentemente, com o auxílio de um cabo de bisturi nº 3, montado com lâmina de bisturi nº 15C (Swann-Morton, Sheffield, Inglaterra), foi realizada uma incisão nas tíbias direita e esquerda dos animais, medindo aproximadamente 15 mm, paralela ao longo do eixo das tíbias (Figura 2A). O local de eleição para a incisão foi estabelecido pela porção mais volumosa do tecido ósseo, através da palpação. O tecido muscular foi seccionado até a exposição do periósteo. O descolamento foi realizado utilizando descoladores de Freer e de Molt e com o auxílio de uma pinça de Adson com dente. Esses mesmos instrumentos, juntamente com uma pinça anatômica, auxiliaram no afastamento do retalho e estabilização da tibia (Figura 2B). Para melhora da hemostasia no campo operatório foi utilizada gaze estéril.

A cirurgia para a instalação dos implantes (um em cada tibia) foi realizada por meio uma perfuração com uma broca piloto com 1.0 mm de diâmetro e 15 mm de comprimento (S.I.N. – Sistema de Implante, São Paulo, Brasil) sob constante irrigação com solução salina (0,9%), utilizando um motor de implante (Dentscler, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) numa

rotação de 1000 rpm (Figura 2C e 2D), conforme recomendado pelo fabricante (S.I.N. – Sistema de Implante, São Paulo, Brasil). Todos os mini-implantes foram especialmente preparados pela empresa S.I.N (Sistema de Implante, São Paulo, Brasil) para essa pesquisa, e tinham macroestrutura igual, com formato de parafuso e as seguintes dimensões: 2,7 mm de comprimento e 1,4 mm de diâmetro (Figura 3).

Os implantes foram instalados, aleatoriamente, com o auxílio de uma chave de mão (S.I.N. – Sistema de Implante, São Paulo, Brasil) de forma que as roscas ficassem completamente introduzidas no interior do osso cortical (Figura 2E). O ato cirúrgico foi finalizado por meio de pontos simples, utilizando fios de sutura absorvíveis (Vicryl Ethicon 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, São Paulo, Brasil) (Figura 2F).

Figura 2. Cirurgia para instalação dos implantes. A) Incisão medindo aproximadamente 2 cm, paralela ao longo do eixo das tíbias. B) Aspecto encontrado após abertura do retalho. C e D) Cirurgia para a instalação dos implantes sob constante irrigação com soro fisiológico. E) Implante instalado com as roscas completamente introduzidas no interior do osso cortical. F) Síntese.

Figura 3. Macroestrutura do implante (2,7 mm de comprimento e 1,4 mm de diâmetro).

Após a cirurgia, os animais receberam uma dose única de antibiótico via intramuscular de Penicilina G-benzatina (24.000 UI/kg) na dose de 0,01 ml para cada 100g do peso corpóreo do rato (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil) e um anti-inflamatório na concentração de 0,3 mg/ml – dose 0,05mg/kg - Injeção subcutânea, 12/12 horas (Buprenorfina, Plurivet Richter Pharma AG, Austria, Inglaterra). Nenhuma restrição de movimentação ou alimentação foi feita após a cirurgia, e os mesmos foram mantidos em caixas plásticas apropriadas durante todo o período experimental. Todos os animais se recuperaram bem após os procedimentos e não necessitaram de doses adicionais de medicamentos.

3.4 Grupos experimentais

Os 72 animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais, cada qual contendo 12 ratos:

- GRUPO 1 (n=12) – Rato saudável (SD) – superfície LISA. Foram instalados nas tíbias de ratos saudáveis, mini implantes de superfície lisa (sem nenhum outro tratamento de superfície a não ser os sulcos normais de usinagem);

- GRUPO 2 (n=12) – Rato saudável (SD) – superfície tratada com duplo ataque ácido (DAA). Foram instalados nas tíbias de ratos saudáveis, mini implantes com superfície tratada com duplo ataque ácido;

- GRUPO 3 (n=12) – Rato saudável (SD) – superfície tratada com adição de nano-hidroxiapatita (NANO). Foram instalados nas tíbias de ratos saudáveis, mini implantes com superfície tratada com adição de nano-hidroxiapatita;

- GRUPO 4 (n=12) – Rato Diabético (DM) – superfície LISA. Foram instalados nas tíbias de ratos diabéticos, mini implantes de superfície lisa;

- GRUPO 5 (n=12) – Rato Diabético (DM) – superfície com duplo ataque ácido (DAA). Foram instalados nas tíbias de ratos diabéticos, mini implantes com superfície tratada com duplo ataque ácido;

- GRUPO 6 (n=12) – Rato Diabético (DM) – superfície tratada com adição de nano-hidroxiapatita (NANO). Foram instalados nas tíbias de ratos diabéticos, mini implantes com superfície tratada com adição de nano-hidroxiapatita.

Os animais foram eutanasiados com aprofundamento anestésico de 150 mg/kg de tiopentato de sódio 2.5% (Thiopentax, Cristália, São Paulo, Brasil), via intraperitoneal, nos períodos de 7 e 30 dias após a instalação dos implantes (36 animais para cada tempo, 6 de cada um dos grupos experimentais).

As tíbias esquerdas foram removidas e fixadas em 10% de formol tamponado para posterior análise tridimensional por micro-CT, processamento histológico/análise histomorfométrica e teste de nanoindentação (Figura 4A e 4B). As tíbias direitas foram removidas com o auxílio de uma trefina de 3 mm de diâmetro (Alpha instrumentos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) (Figura 5A e 5B), lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, EUA) (Figura 5C), armazenadas em nitrogênio líquido e em seguida no freezer -80°C para posterior avaliação da expressão gênica.

Figura 4. Remoção e preparo do material para posterior análise tridimensional por micro-CT, processamento histológico/análise histomorfométrica e teste de nanoindentação. A) Aspecto inicial. B) Tíbia esquerda removida para análise tridimensional por micro-CT, processamento histológico/análise histomorfométrica e teste de nanoindentação.

Figura 5. Remoção e preparo do material para posterior avaliação da expressão gênica. A) Aspecto inicial. B) Remoção do implante e tecido ósseo adjacente com o auxílio de uma trefina de 3 mm de diâmetro. C) Lavagem da amostra com solução de PBS.

3.5 Análise microtomográfica

Após 48 horas de fixação em formol tamponado a 10%, as amostras foram escaneadas utilizando o Microtomógrafo SkyScan 1172-160 micro-CT de alta resolução (Bruker, Kontich, Antwerp, Bélgica) para a obtenção das projeções tomográficas bidimensionais e a reconstrução tridimensional. Todas os escaneamentos foram obtidas em 100 kV e 100 μ A, usando um filtro de alumínio-cobre para otimizar o contraste, e definido em 5,87 mm de tamanho de pixel, rotação de 360°, um passo de rotação de 0,40. As projeções tomográficas bidimensionais e a reconstrução tridimensional foram realizadas utilizando o software NRecon (NRecon v.1.6.10.4, Bruker, Kontich, Antwerp, Bélgica) e os implantes foram posicionados no seu longo eixo utilizando o software DataViewer (v.1.5.0, Bruker, Kontich, Antwerp, Bélgica), onde é possível a movimentação e visualização dos três eixos (coronal, axial e sagital). Foi selecionado o eixo de interesse (sagital) para a visualização completa dos implantes.

Sequentemente, as reconstruções foram submetidas a análise morfométrica utilizando o software CT Analyser (CTAn., v.1.15.4.0, Bruker, Kontich, Antwerp, Bélgica) para a obtenção dos seguintes parâmetros estruturais no osso interno às roscas dos implantes: contato tridimensional osso implante (IS/TS, %), relação entre volume ósseo e superfície óssea (BV/TV, %), relação entre superfície óssea e volume ósseo (BS/BV, mm), separação trabecular (Tb.Sp, %) e porosidade total (Po.To, %).

No CTAN utilizamos uma ferramenta de análise avançada (*custom processing*), onde criamos uma lista de tarefas para análise dos parâmetros adotados. As medições foram feitas a partir de 1 mm da porção mais coronal do implante, atingindo todo o seu comprimento. Esse processo envolveu a determinação 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 (VOI), representando o volume 3D selecionado. A binarização foi realizada usando a escala de cinza definida por uma densidade de 35-150 para osso, e 150-255 para implante. Todas as análises de micro-CT foram realizadas por um único examinador, cego para os grupos experimentais.

3.6 Processamento e análise histológica

Após a realização da microtomografia, os espécimes foram transferidos para uma solução de 70% álcool por 72 horas e, então, desidratados de forma ascendente, até atingir a

concentração de 100%. Após a desidratação, as tíbias foram incluídas em resina Hard Grade LR White (London Resin Company, Londres, Reino Unido) e cortadas usando Exakt Cutting System (Exakt, Norderstedt, Hamburgo, Alemanha). Os cortes longitudinais obtidos foram polidos e montados em lâminas de acrílico, utilizando o Exakt Grinding System (Exakt). As secções de 40 µm de espessura foram reduzidas para uma espessura de 20 µm e coradas com Stevenel's blue e Vermelho de Alizarina. Em seguida, foram digitalizadas através de um sistema automático de digitalização de dispositivos e software de computador especializado (Aperio Technologies, Vista, Califórnia, EUA).

Para avaliação histomorfométrica, um software de análise de imagens (ImageJ, NIH, Bethesda, Maryland, EUA) foi utilizado para quantificar e avaliar os parâmetros de osseointegração em torno da superfície peri-implantar. A porcentagem de contato osso-implante (% BIC) quantifica o grau de osseointegração derivada da estabilidade primária, medindo a porcentagem de osso em contato com o perímetro da superfície do implante (Figura 6A). Já a densidade óssea ao redor dos implantes % BAFO avalia o grau de osseointegração derivada da estabilidade secundária, medindo a porcentagem de osso (osso neoformado, osso nativo recém-formado e não vital devido à instrumentação) dentro das roscas do implante (Figura 6B) (Coelho et al. 2012; Gil et al. 2017; Jinno et al. 2017). Todas as avaliações foram realizadas por um único examinador, cego para os grupos experimentais.

Figura 6. Esquema ilustrativo dos locais das medições de BIC (A) e BAFO (B).

3.7 Teste mecânico de nanoindentação

O teste de nanoindentação foi realizado conforme previamente descrito por Coelho et al., 2014 (Coelho et al. 2014a). Os blocos de resina foram processados da mesma maneira que

os cortes histológicos, sem coloração, polidos com suspensões de diamante de 9 a 1 μm de tamanho de partícula (Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) e hidratados por 24 horas. O módulo de elasticidade e a dureza do osso neoformado foram avaliados no nanoindentador (Hysitron TI 950, Minneapolis, Minnesota, EUA) ($n = 30$ por amostra) equipado com uma ponta em forma de pirâmide de três lados com diamante Berkovich (Baldassarri et al. 2012). Um perfil de carga foi desenvolvido com uma carga de pico de 300 μN a uma taxa de 60 $\mu\text{N}/\text{seg}$, seguido por um tempo de espera de 10 segundos e um tempo de descarga de 2 segundos. O período de carga prolongado permitiu que o osso relaxasse para uma resposta mais linear, de modo que nenhum efeito de fluência tecidual ocorreu na porção de descarga do perfil (ISO 14577-4). Ao fim de cada indentação uma curva de deslocamento de carga foi obtida (Doerner and Nix 1986).

Para cada amostra, o teste mecânico foi realizado dentro da região de rosca, localizada entre a primeira e a segunda rosca. Se não houvesse osso cortical nessa região, o espécime foi descartado. O tecido ósseo nessas regiões foi detectado inicialmente por meio de imagem através de um microscópio de luz (Hysitron) (Doerner and Nix 1986).

A partir de cada curva de deslocamento de carga gerada, o módulo de elasticidade (ME, em GPa) e a dureza (D, em GPa) do tecido ósseo cortical foram calculados por meio do software Hysitron TriboScan usando as seguintes fórmulas, respectivamente:

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi}}{2\sqrt{A(h_c)}} \times S; \quad H = \frac{P_{\max}}{A(h_c)}$$

Onde S é a rigidez, h_c é a profundidade de contato, $P_{\max}$ é a força máxima aplicada (300 μN) e $A(h_c)$ é a área de contato computada do software TriboScan utilizando a função de área com relação à profundidade de contato. Através do módulo reduzido E_r , o módulo de elasticidade correspondente E_b (GPa) pode ser calculado usando a seguinte equação:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu_b^2}{E_b} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i}$$

Onde ν_b (0,3) é o coeficiente de Poisson para o osso cortical, E_i (1140 GPa) é o módulo elástico do penetrador, e ν_i (0,07) é o coeficiente de Poisson para o penetrador (Hoffler et al. 2005; Hoffler et al. 2000). Essa metodologia mostrou-se bem sucedida na

determinação das propriedades mecânicas do osso através da nanoindentação (Anchieta et al. 2014; Baldassarri et al. 2012; Jimbo et al. 2013; Jimbo et al. 2012a; Lee et al. 2013).

3.8 Avaliação da expressão gênica

3.8.1 Extração de RNA (ácido ribonucleico) total

As amostras (2 tíbias do mesmo grupo) foram colocadas em um cadinho 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). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente durante 15 minutos e armazenadas no freezer -20°C até serem processadas. Ao final, foi possível obter quantidade de RNA total para realização dos experimentos envolvendo expressão gênica.

No momento da extração do RNA, para cada 1 mL do reagente Trizol (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, EUA) foram adicionados 250 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os tubos foram vigorosamente agitados por 30 segundos e mantidos no gelo durante 5 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 12000 g, por 15 minutos, e a fase aquosa (superior) coletada em novos tubos de 2 mL (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Em seguida, foram adicionados 250 µL de etanol 96% (Merck, Darmstadt, Alemanha) às amostras e as mesmas centrifugadas em colunas de sílica gel presentes no kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, 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, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 nm e as razões 260:280 nm e 260:230 nm para a obtenção da concentração de RNA/µL e verificação de 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.

3.8.2 Síntese da fita de DNA (ácido desoxirribonucleico) 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, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, em um tubo de 200 µL (Axygen Scientific Inc., Union City, EUA) foram adicionados: 1 µg de RNA total diluído em um volume final de 10 µL de água previamente tratada com DEPC (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), 2 µL de (10X) RT buffer, 0,8 µL de (25X) dNTP mix (100 mM), 2 µL (10X) RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase Inhibitor e 3,2 µL de água DEPC, para um volume final de 20 µL/reação. Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf AG) sob as seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos, seguido pelo resfriamento a 4°C. Ao final da reação de transcrição reversa as amostras de DNAc foram estocadas em freezer -20°C.

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

Para realização da técnica de PCR em tempo real foi utilizado o sistema de sondas Taqman em um aparelho StepOnePlus (Life Technologies). Para cada reação foram adicionados: 5 µL de Taqman® Gene Expression Master Mix (2X)², 0,5 µL de (20X) Taqman® Gene Expression Master Mix e 4,5 µL de cDNA (11,25 ng), para um volume final de 10 µL/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.

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold), 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 gene avaliado. O gene de referência Gapdh foi utilizado para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo e o grupo saudável 7 dias (superfície LISA) foi considerado calibrador das amostras. Uma amostra negativa (água) foi 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 and Schmittgen 2001).

3.9 Análise Estatística

Todas as variáveis foram apresentadas em função dos valores médios com o intervalo de confiança correspondente a 95% (média $\pm$ 95% IC). Análises preliminares mostraram variâncias indistinguíveis (teste de Levene, todas $p > 0,25$). Adicionalmente, os dados foram coletados e alinhados ao longo de um modelo linear misto com fatores fixos de tempo (7 e 30 dias), condição sistêmica (saudável e diabético) e modificações de superfície (lisa, duplo ataque ácido e nano-hidroxiapatita). Teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas. A análise foi realizada usando SPSS (IBM SPSS 23, IBM Corp., Armonk, Nova York, EUA).

4 Resultados

4 RESULTADOS

Não houve complicações relacionadas ao procedimento cirúrgico, todos os animais recuperaram a consciência até 30 minutos após a cirurgia e o período pós-operatório transcorreu sem intercorrências. Adicionalmente, não foram detectados eventos adversos, como a exposição do implante, e foi observado um aspecto clinicamente saudável na área operada ao longo de todo o período experimental.

A figura 7 demonstra os valores de glicemia (mg/dL) (média e desvio padrão) dos grupos saudável e diabético no momento da instalação dos implantes e no dia da eutanásia. Os valores encontrados para o grupo saudável (cirurgia: $89,55 \pm 8,88$ e eutanásia: $92,19 \pm 9,67$) e diabético (cirurgia: $499,88 \pm 62,27$ e eutanásia: $544,63 \pm 57,07$) confirmam o estabelecimento do modelo proposto.

Figura 7. Valores de glicemia (mg/dL) (média e desvio padrão) os grupos saudável e diabético no momento da instalação dos implantes e no dia da eutanásia

4.1 Resultados Microtomográficos

Uma avaliação qualitativa das imagens reconstruídas em 3D de todos os grupos experimentais é evidenciada na Figura 8 (A-L). Todas as imagens confirmam o reparo ósseo bem sucedido, independentemente do tempo, tipo de implante e condição sistêmica. Uma diferença expressiva foi observada entre 7 e 30 dias. Com relação ao tratamento de superfície, o grupo NANO evidenciou um contato ósseo mais íntimo ao implante quando comparado às

superfícies LISA e DAA. Além disso, aos 30 dias, implantes com revestimento NANO representaram locais de remodelação aumentados e formação de novo osso em comparação ao período experimental de 7 dias.

Figura 8. (A-L) Reconstrução das imagens em 3D. Implante com superfície LISA (A, D, G e J), DAA (B, E, H, K) e NANO (C, F, I, L) instalados em tíbias de ratos saudáveis (A, B, C) e diabéticos (D, E, F) nos tempos de 7 (A-F) e 30 (G-L) dias.

4.1.1 Contato tridimensional osso implante (IS/TS)

A porcentagem do contato tridimensional osso implante (% IS/TS) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significantes entre 7 ($24,74 \pm 1,11$) e 30 ($40,47 \pm 1,11$) dias ($p < 0.001$) (Figura 9 A). O grupo saudável ($35,23 \pm 1,11$) apresentou maior % IS/TS quando comparado ao diabético ($29,98 \pm 1,11$) (dados em função da condição sistêmica) ($p < 0.001$) (Figura 9 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($38,52 \pm 1,36$) exibiu maior % IS/TS em relação aos grupos LISA ($26,60 \pm 1,36$) e DAA ($32,69 \pm 1,36$) (dados em função da superfície do implante) ($p < 0.001$) (Figura 9 C). Comparando tempo e condição sistêmica, o grupo saudável 30 dias ($44,01 \pm 1,57$) apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos demais grupos experimentais (saudável 7 dias = $26,44 \pm 1,57$, diabético 7 dias = $23,05 \pm 1,57$, diabético 30 dias = $36,92 \pm 1,57$) ($p < 0.004$) (Figura 9 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante, evidenciou uma superioridade do grupo NANO 30 dias ($46,14 \pm 1,92$) em relação aos demais (LISA 7 dias = $18,70 \pm 1,92$, DAA 7 dias = $24,63 \pm 1,92$, NANO 7 dias $30,91 \pm 1,92$, LISA 30 dias = $34,50 \pm 1,92$, DAA 30 dias = $40,75 \pm 1,92$) ($p < 0.001$) (Figura 9 E). Quando a % IS/TS foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo NANO saudável ($40,82 \pm 1,92$) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0.001$) (Figura 9 F). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que a superfície NANO apresentou os melhores resultados aos 7 dias (saudável = $32,34 \pm 2,72$ e diabético = $29,47 \pm 2,72$) e aos 30 dias (saudável = $49,30 \pm 2,72$) ($p < 0.046$) (Figura 10).

Figura 9. A-F. Gráficos representando % IS/TS ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 10. Gráfico representando a % IS/TS quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.1.2 Densidade óssea tridimensional (BV/TV)

A porcentagem da densidade óssea tridimensional (% BV/TV) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significante entre 7 ($16,16 \pm 0,58$) e 30 ($21,12 \pm 0,58$) dias ($p < 0,001$) (Figura 11 A). O grupo saudável ($19,22 \pm 0,58$) apresentou maior % BV/TV quando comparado ao diabético ($18,07 \pm 0,58$) (dados em função da condição sistêmica) ($p = 0,007$) (Figura 11 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($20,97 \pm 0,71$) exibiu maior % BV/TV em relação aos grupos LISA ($16,60 \pm 0,71$) e DAA ($18,36 \pm 0,71$) (dados em função da superfície do implante) ($p < 0,001$) (Figura 11 C). Comparando tempo e condição sistêmica, os grupos 30 dias (saudável = $21,82 \pm 0,82$ e diabético = $20,42 \pm 0,82$) apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo de 7 dias (saudável = $16,62 \pm 0,82$ e diabético = $15,71 \pm 0,82$) ($p < 0,001$) (Figura 11 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante, evidenciou uma superioridade do grupo NANO aos 30 dias ($23,58 \pm 1,01$) em relação aos demais (LISA 7 dias = $13,98 \pm 1,01$, DAA 7 dias = $16,15 \pm 1,01$, NANO 7 dias = $18,36 \pm 1,01$, LISA 30 dias = $19,22 \pm 1,01$, DAA 30 dias = $20,56 \pm 1,01$) ($p < 0,001$) (Figura 11 E). Quando a % BV/TV foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, os grupos NANO saudável ($20,85 \pm 1,01$) e diabético ($21,08 \pm 1,01$) apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,027$) (Figura 11 F). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os

resultados evidenciaram que a superfície NANO apresentou os melhores resultados aos 7 dias (saudável = $18,51 \pm 1,43$ e diabético = $18,20 \pm 1,43$) e aos 30 dias (saudável = $23,20 \pm 1,43$ e diabético = $23,95 \pm 1,43$) ($p < 0.001$) (Figura 12).

Figura 11. A-F. Gráficos representando % BV/TV ao redor do implante, organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 12. Gráfico representando a % BV/TV quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.1.3 Relação da superfície óssea pelo volume ósseo (BS/BV)

A relação da superfície óssea pelo volume ósseo (BS/BV) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 ($96,28 \pm 1,65$) e 30 ($81,77 \pm 1,65$) dias ($p < 0.001$) (Figura 13 A). Não houve diferença entre o grupo saudável ($88,55 \pm 1,65$) e diabético ($89,51 \pm 1,65$) (dados em função da condição sistêmica) ($p = 0.414$) (Figura 13 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($95,28 \pm 2,02$) exibiu maior BS/BV em relação aos grupos LISA ($85,25 \pm 2,02$) e DAA ($86,55 \pm 2,02$) (dados em função da superfície do implante) ($p < 0.001$) (Figura 13 C). Comparando tempo e condição sistêmica, os grupos de 7 dias (saudável = $95,99 \pm 2,33$ e diabético = $96,58 \pm 2,33$) apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação aos grupos de 30 dias (saudável = $81,11 \pm 2,33$ e diabético = $82,43 \pm 2,33$) ($p < 0.001$) (Figura 13 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante evidenciou uma superioridade do grupo NANO 7 dias ($105,34 \pm 2,86$) em relação aos demais (LISA 7 dias = $90,99 \pm 2,86$, DAA 7 dias = $92,52 \pm 2,86$, LISA 30 dias = $79,31 \pm 2,86$, DAA 30 dias = $80,57 \pm 2,86$, NANO 30 dias = $85,23 \pm 2,86$) ($p < 0.025$) (Figura 13 E). Quando a BS/BV foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo NANO saudável ($98,17 \pm 2,86$) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0.006$) (Figura 13 F). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que a superfície

NANO saudável apresentou os melhores resultados aos 7 dias ($109,87 \pm 4,04$) ($p=0.003$) (Figura 14).

Figura 13. A-F. Gráficos representando BS/BV ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 14. Gráfico representando BS/BV quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.1.4 Separação Trabecular (Tb.Sp)

A separação trabecular (Tb.Sp) em função do tempo não demonstrou diferença estatisticamente significantes entre 7 ($0,44 \pm 0,04$) e 30 ($0,43 \pm 0,04$) dias ($p=0.844$) (Figura 15 A). Não houve diferença entre o grupo saudável ($0,41 \pm 0,04$) e diabético ($0,46 \pm 0,04$) (dados em função da condição sistêmica) ($p=0.116$) (Figura 15 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($0,50 \pm 0,05$) exibiu maior Tb.Sp em relação aos grupos LISA ($0,39 \pm 0,05$) e DAA ($0,42 \pm 0,05$) (dados em função da superfície do implante) ($p=0.013$) (Figura 15 C). Não houve diferenças estatisticamente significantes ao comparar tempo e condição sistêmica ($p>0.208$) (Figura 15 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante demonstrou para o grupo NANO 7 dias ($0,49 \pm 0,07$) valores equivalentes aos grupos DAA e NANO 30 dias ($p>0.715$) (Figura 15 E). Ao avaliar Tb.Sp em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo diabético NANO ($0,55 \pm 0,11$) apresentou diferenças significantes em relação aos outros grupos ($p<0.046$) (Figura 15F). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que a superfície NANO apresentou os melhores resultados aos 7 dias (diabético = $0,54 \pm 0,11$) e aos 30 dias (diabético = $0,57 \pm 0,11$) ($p<0.029$) (Figura 16).

Figura 15. A-F. Gráficos representando Tb.Sp ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 16. Gráfico representando Tb.Sp quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.1.5 Porcentagem porosidade total (Po.To)

A porcentagem de porosidade total (% Po.To) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 ($83,29 \pm 0,58$) e 30 ($80,15 \pm 0,58$) dias ($p < 0,001$) (Figura 17 A). O grupo saudável ($80,76 \pm 0,58$) apresentou maior % Po.To quando comparado ao diabético ($82,69 \pm 0,58$) (dados em função da condição sistêmica) ($p < 0,001$) (Figura 17 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($84,39 \pm 0,71$) exibiu maior % Po.To em relação aos grupos LISA ($80,22 \pm 0,71$) e DAA ($80,57 \pm 0,71$) (dados em função da superfície do implante) ($p < 0,001$) (Figura 17 C). Não houve diferenças estatísticas ao comparar tempo e condição sistêmica ($p = 0,643$) (Figura 17 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante evidenciou uma superioridade do grupo NANO 7 dias ($87,04 \pm 1,01$) em relação aos demais (LISA 7 dias = $81,38 \pm 1,01$, DAA 7 dias = $81,46 \pm 1,01$, LISA 30 dias = $79,05 \pm 1,01$, DAA 30 dias = $79,68 \pm 1,01$, NANO 30 dias = $81,73 \pm 1,01$) ($p < 0,016$) (Figura 17 E). Quando % Po.To foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo NANO diabético ($85,53 \pm 1,01$) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Figura 17 F). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que a superfície

NANO apresentou os melhores resultados aos 7 dias (saudável = $86,90 \pm 1,43$ e diabético = $87,19 \pm 1,43$) e aos 30 dias (diabético = $83,87 \pm 1,43$) ($p < 0.022$) (Figura 18).

Figura 17. A-F. Gráficos representando % Po.To ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 18. Gráfico representando % Po.To quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.2 Resultados Histomorfométricos:

Uma avaliação qualitativa das micrografias histológicas de todos os grupos é evidenciada na Figura 19 (A-L). Todas as imagens confirmam uma osseointegração bem sucedida, independentemente do tempo, tipo de implante e condição sistêmica. No geral, foi evidente a diferença observada entre 7 e 30 dias. Com relação ao tratamento de superfície, o grupo NANO apresentou um contato ósseo mais íntimo ao implante quando comparado a superfície LISA e DAA. Além disso, aos 30 dias, micrografias de implantes de revestimento NANO representaram locais de remodelação aumentados e formação de novo osso em comparação com imagens de 7 dias.

Figura 19. A-L. Imagens histológicas coradas com Stevenel's blue e Vermelho de Alizarina de todos os grupos experimentais. Grupo saudável (A, B, C, G, H e I) e diabético (D, E, F, J, K e L) dos implantes com superfície LISA (A, D, G e J), DAA (B, E, H e K) e NANO (C, F, I e L).

4.2.1 Contato osso implante (BIC)

Correlacionando a análise histológica, as medidas histomorfométricas da porcentagem de contato osso-implante (% BIC) em função do tempo demonstraram diferença estatisticamente significativa entre 7 ($25,32 \pm 2,61$) e 30 ($59,69 \pm 2,61$) dias ($p < 0.001$) (Figura 20 A). Não foram encontradas diferenças significativas ao comparar o grupo saudável ($43,03 \pm 2,61$) e diabético ($41,96 \pm 2,61$) (dados em função da condição sistêmica) ($p = 0.632$) (Figura 20 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($57,39 \pm 3,20$) exibiu maior % BIC em relação aos grupos LISA ($32,35 \pm 3,20$) e DAA ($37,74 \pm 3,20$) (dados em função da superfície do implante) ($p < 0.001$) (Figura 20 C). Ao comparar tempo e condição sistêmica, os grupos 30 dias (saudável = $59,37 \pm 4,27$, diabético = $59,66 \pm 4,27$) apresentaram diferenças significantes em relação aos grupos 7 dias (saudável 7 dias = $28 \pm 4,27$, diabético 7 dias = $25,65 \pm 4,27$) ($p < 0.001$) (Figura 20 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante evidenciou a superioridade do grupo NANO 30 dias ($74,13 \pm 4,53$) em relação aos demais (LISA 7 dias = $13,62 \pm 4,53$, DAA 7 dias = $21,62 \pm 4,53$, NANO 7 dias = $40,65 \pm 4,53$, LISA 30 dias = $51,07 \pm 4,53$, DAA 30 dias = $53,87 \pm 4,53$) ($p < 0.001$) (Figura 20 E). Quando a % BIC foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo NANO diabético ($62,58 \pm 4,53$) apresentou diferença estatística significativa ($p < 0.001$) (Figura 20 F). Avaliando todos os fatores: tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície, os resultados evidenciaram que a superfície NANO apresentou os melhores resultados nos grupos diabéticos 7 dias ($35,94 \pm 6,40$) e 30 dias ($79,80 \pm 6,40$) ($p < 0.001$) (Figura 21).

Figura 20. A-F. Gráficos representando a % BIC organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 21. Gráfico representando a % BIC quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.2.2 Densidade óssea ao redor do implante (BAFO)

A porcentagem da densidade óssea ao redor do implante (% BAFO) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significantes entre 7 ($31,46 \pm 2,99$) e 30 ($52,87 \pm 2,99$) dias ($p < 0.001$) (Figura 22 A). O grupo saudável ($44,31 \pm 2,99$) apresentou maior % BAFO quando comparado ao diabético ($40,02 \pm 2,99$) (dados em função da condição sistêmica) ($p = 0.048$) (Figura 22 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($47,64 \pm 3,66$) exibiu maior % BAFO em relação aos grupos LISA ($38,80 \pm 3,66$) e DAA ($40,05 \pm 3,66$) (dados em função da superfície do implante) ($p = 0.002$) (Figura 22 C). Comparando tempo e condição sistêmica, o grupo saudável 30 dias ($59,16 \pm 4,23$) apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos demais grupos experimentais (saudável 7 dias = $29,45 \pm 4,23$, diabético 7 dias = $33,47 \pm 4,23$, diabético 30 dias = $46,58 \pm 4,23$) ($p < 0.001$) (Figura 22 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante, evidenciou uma superioridade do grupo NANO 30 dias ($56,95 \pm 5,18$) dias em relação aos demais (LISA 7 dias = $26,83 \pm 5,18$, DAA 7 dias = $29,22 \pm 5,18$, NANO 7 dias = $38,34 \pm 5,18$, LISA 30 dias = $50,77 \pm 5,18$, DAA 30 dias = $50,88 \pm 5,18$) ($p < 0.001$) (Figura 22 E). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quando a % BAFO foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície ($p = 0.616$) (Figura 22 F). Avaliando

todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que a superfície NANO apresentou os melhores resultados aos 7 dias (saudável = $38,28 \pm 7,33$ e diabético = $38,39 \pm 7,33$) ($p < 0.009$) (Figura 23).

Figura 22. A-F. Gráficos representando a %BAFO ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.

Figura 23. Gráfico representando a % BAFO ao redor do implante quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.3 Resultados de nanoindentação:

Imagens representativas das áreas aonde foram realizados os ensaios de nanoindentação estão evidenciados na figura 24. Para cada implante, o teste mecânico foi realizado dentro da região de rosca, localizada entre a primeira e a segunda rosca, num total de 30 indentações por amostra.

Figura 24. A-L. Imagens representativas das áreas aonde foram realizados os ensaios de nanoindentação de todos os grupos experimentais (A-L). Grupo saudável (A, B, C, G, H e I) e diabético (D, E, F, J, K e L) dos implantes com superfície LISA (A, D, G e J), DAA (B, E, H e K) e NANO (C, F, I e L).

4.3.1 Módulo de elasticidade (ME)

O módulo elasticidade (ME) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 ($8,94 \pm 1,36$) e 30 ($14,14 \pm 1,22$) dias ($p < 0.001$) (Figura 25 A). Não foram encontradas diferenças significantes ao comparar o grupo saudável ($11,07 \pm 1,35$) e diabético ($12,01 \pm 1,24$) (dados em função da condição sistêmica) ($p = 0.308$) (Figura 25 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($14,89 \pm 1,59$) exibiu maior ME em relação aos grupos LISA ($7,28 \pm 1,51$) e DAA ($12,45 \pm 1,65$) (dados em função de superfície do implante) ($p < 0.037$) (Figura 25 C). Comparando tempo e condição sistêmica, o grupo saudável 30 dias ($15,06 \pm 1,87$) apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos demais grupos experimentais (saudável 7 dias = $7,08 \pm 1,95$, diabético 7 dias = $10,79 \pm 1,90$, diabético 30 dias = $13,22 \pm 1,60$) ($p < 0.001$) (Figura 25 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante evidenciou a superioridade do grupo NANO em 30 dias ($16,70 \pm 1,97$) em relação aos demais (LISA 30 dias = $12,52 \pm 2,23$, DAA 30 dias = $13,20 \pm 2,16$) ($p < 0.027$) (Figura 25 E). Quando o ME foi avaliado em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo diabético NANO ($15,71 \pm 2,16$) apresentou diferença estatística significativa ($p < 0.001$) (Figura 25 F). Avaliando todos os fatores: tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície, os resultados evidenciaram que os implantes com tratamento de superfície apresentaram ME superior à superfície LISA ($p < 0.031$) (Figura 26).

Figura 25. A-F. Gráficos representando o ME ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.

Figura 26. Gráfico representando o ME ao redor do implante quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.3.2 Dureza (D)

A dureza (D) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 ($0,31 \pm 0,06$) e 30 ($0,64 \pm 0,05$) dias ($p < 0,001$) (Figura 27 A). O grupo saudável ($0,53 \pm 0,06$) apresentou maior D quando comparado ao diabético ($0,42 \pm 0,05$) (dados em função da condição sistêmica) ($p = 0,015$) (Figura 27 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($0,66 \pm 0,07$) exibiu maior D em relação aos grupos LISA ($0,34 \pm 0,07$) e DAA ($0,43 \pm 0,07$) (dados em função da superfície do implante) ($p < 0,037$) (Figura 27 C). Comparando tempo e condição sistêmica, o grupo saudável 30 dias ($0,81 \pm 0,08$) apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos demais grupos experimentais (saudável 7 dias = $0,25 \pm 0,09$, diabético 7 dias = $0,38 \pm 0,09$, diabético 30 dias = $0,46 \pm 0,08$) ($p < 0,001$) (Figura 27 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante evidenciou a superioridade do grupo NANO em 30 dias ($0,9 \pm 0,09$) em relação aos demais (LISA 30 dias = $0,55 \pm 0,10$, DAA 30 dias = $0,47 \pm 0,10$) ($p < 0,027$) (Figura 27 E). Quando o D foi avaliado em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo saudável NANO ($0,79 \pm 0,11$) apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,002$) (Figura 27 F). Avaliando todos os fatores: tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície, os resultados evidenciaram que os implantes com tratamento de superfície apresentaram D superior à

superfície LISA ($p < 0.025$), e que o grupo NANO saudável 30 dias ($1,25 \pm 0,14$) apresentou os maiores valores para D (Figura 28).

Figura 27. A-F. Gráficos representando D ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 28. Gráfico representando a D ao redor do implante quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.4 Resultados de expressão gênica:

4.4.1 Fator de transcrição “runt-related” 2 (Runx2)

A expressão relativa do Fator de transcrição “runt-related” 2 (Runx2) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 ($1,00 \pm 0,05$) e 30 ($1,88 \pm 0,05$) dias ($p < 0,001$) (Figura 29 A). O grupo saudável ($1,90 \pm 0,05$) apresentou maior expressão relativa de Runx2 quando comparado ao diabético ($0,98 \pm 0,05$) (dados em função da condição sistêmica) ($p < 0,001$) (Figura 29 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($2,23 \pm 0,06$) exibiu maior expressão relativa de Runx2 em relação aos grupos LISA ($0,58 \pm 0,06$) e DAA ($1,52 \pm 0,06$) (dados em função da superfície do implante) ($p < 0,001$) (Figura 29 C). Comparando tempo e condição sistêmica, o grupo saudável 30 dias ($2,77 \pm 0,07$) apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos demais grupos experimentais (saudável 7 dias = $1,04 \pm 0,07$, diabético 7 dias = $0,96 \pm 0,07$, diabético 30 dias = $1,00 \pm 0,07$) ($p < 0,001$) (Figura 29 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante, evidenciou uma superioridade do grupo NANO 30 dias ($2,97 \pm 0,09$) dias em relação aos demais (LISA 7 dias = $0,62 \pm 0,09$, DAA 7 dias = $0,89 \pm 0,09$, NANO 7 dias = $1,49 \pm 0,09$, LISA 30 dias = $0,53 \pm 0,09$, DAA 30 dias = $2,14 \pm 0,09$) ($p < 0,001$)

(Figura 29 E). Quando a expressão relativa de Runx2 foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo NANO saudável ($2,90 \pm 0,09$) apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos outros grupos experimentais ($p < 0.001$) (Figura 29 F). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que a superfície NANO apresentou os melhores resultados aos 7 dias (diabético = $1,78 \pm 0,13$) e aos 30 dias (saudável = $4,59 \pm 0,13$) ($p < 0.035$) (Figura 30).

Figura 29. A-F. Expressão relativa de Runx2 com dados organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 30. Expressão relativa de Runx2 quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.4.2 Fosfatase alcalina (Alp)

A expressão relativa de Fosfatase alcalina (Alp) em função do tempo não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 ($1,09 \pm 0,04$) e 30 ($1,05 \pm 0,04$) dias ($p=0.152$) (Figura 31 A). O grupo saudável ($1,48 \pm 0,04$) apresentou maior expressão relativa de Alp quando comparado ao diabético ($0,66 \pm 0,04$) (dados em função da condição sistêmica) ($p<0.001$) (Figura 31 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($1,70 \pm 0,05$) exibiu maior expressão relativa de Alp em relação aos grupos LISA ($0,48 \pm 0,05$) e DAA ($1,03 \pm 0,05$) (dados em função da superfície do implante) ($p<0.001$) (Figura 31 C). Comparando tempo e condição sistêmica, o grupo saudável 30 dias ($1,81 \pm 0,06$) apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos demais grupos experimentais (saudável 7 dias = $1,15 \pm 0,06$, diabético 7 dias = $1,03 \pm 0,06$, diabético 30 dias = $0,28 \pm 0,06$) ($p<0.001$) (Figura 31 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante, evidenciou uma superioridade do grupo NANO aos 7 dias ($1,94 \pm 0,07$) em relação aos demais (LISA 7 dias = $0,50 \pm 0,07$, DAA 7 dias = $0,84 \pm 0,07$, LISA 30 dias = $0,46 \pm 0,07$, DAA 30 dias = $1,23 \pm 0,07$, NANO 30 dias = $1,45 \pm 0,07$) ($p<0.001$) (Figura 31 E). Quando a expressão relativa de Alp foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo NANO saudável ($1,88 \pm 0,07$) apresentou diferença estatisticamente significativa

($p < 0.001$) (Figura 31 F). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que a superfície NANO apresentou os melhores resultados aos 7 dias (diabético = $2,57 \pm 0,10$) e aos 30 dias (saudável = $2,44 \pm 0,10$) ($p < 0.001$) (Figura 32).

Figura 31. A-F. Expressão relativa de Alp com dados organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 32. Expressão relativa de Alp quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.4.3 Osteocalcina (Oc)

A expressão relativa de Osteocalcina (Oc) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 ($1,59 \pm 0,10$) e 30 ($2,47 \pm 0,10$) dias ($p < 0.001$) (Figura 33 A). O grupo saudável ($3,34 \pm 0,10$) apresentou maior expressão relativa de Oc quando comparado ao diabético ($0,82 \pm 0,10$) (dados em função da condição sistêmica) ($p < 0.001$) (Figura 33 B). Ao considerar a superfície do implante, os grupos DAA ($2,49 \pm 0,13$) e NANO ($2,37 \pm 0,13$) exibiram maior expressão relativa de Oc em relação ao grupo LISA ($1,25 \pm 0,13$) (dados em função da superfície do implante) ($p < 0.001$) (Figura 33 C). Comparando tempo e condição sistêmica, o grupo saudável 30 dias ($4,49 \pm 0,15$) apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos demais grupos experimentais (saudável 7 dias = $2,02 \pm 0,15$, diabético 7 dias = $1,18 \pm 0,15$, diabético 30 dias = $0,46 \pm 0,15$) ($p < 0.001$) (Figura 33 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante, evidenciou uma superioridade do grupo DAA 30 dias ($3,55 \pm 0,18$) em relação aos demais (LISA 7 dias = $0,50 \pm 0,18$, DAA 7 dias = $1,44 \pm 0,18$, NANO 7 dias = $2,83 \pm 0,18$, LISA 30 dias = $2,01 \pm 0,18$, NANO 30 dias = $1,86 \pm 0,18$) ($p < 0.001$) (Figura 33 E). Quando a expressão relativa de Oc foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo DAA saudável ($4,56 \pm 0,18$) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$) (Figura 33 F). Avaliando

todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que a superfície NANO apresentou os melhores resultados aos 7 dias (diabético = $3,38 \pm 0,26$) ($p < 0.001$) (Figura 34).

Figura 33. A-F. Expressão relativa de Oc organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 34. Expressão relativa de Oc quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.4.4 Osteopontina (Opn)

A expressão relativa de Osteopontina (Opn) em função do tempo não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 ($0,78 \pm 0,01$) e 30 ($0,81 \pm 0,01$) dias ($p < 0,003$) (Figura 35 A). O grupo saudável ($1,18 \pm 0,01$) apresentou maior expressão relativa de Opn quando comparado ao diabético ($0,41 \pm 0,01$) (dados em função da condição sistêmica) ($p < 0,001$) (Figura 35 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo NANO ($1,13 \pm 0,02$) exibiu maior expressão relativa de Opn em relação aos grupos LISA ($0,49 \pm 0,02$) e DAA ($0,77 \pm 0,02$) (dados em função da superfície do implante) ($p < 0,001$) (Figura 35 C). Comparando tempo e condição sistêmica, o grupo saudável 30 dias ($1,45 \pm 0,02$) apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos demais grupos experimentais (saudável 7 dias – $0,91 \pm 0,02$, diabético 7 dias – $0,64 \pm 0,02$, diabético 30 dias – $0,18 \pm 0,02$) ($p < 0,001$) (Figura 35 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante, evidenciou uma superioridade do grupo NANO aos 7 dias ($1,24 \pm 0,02$) em relação aos demais (LISA 7 dias = $0,50 \pm 0,02$, DAA 7 dias = $0,59 \pm 0,02$, LISA 30 dias = $0,48 \pm 0,02$, DAA 30 dias = $0,96 \pm 0,02$ e NANO 30 dias = $1,01 \pm 0,02$) ($p < 0,013$) (Figura 35 E). Quando a expressão relativa de Opn foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo NANO saudável ($1,38 \pm 0,02$) apresentou diferença estatisticamente significativa

($p < 0.001$) (Figura 35 F). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que a superfície NANO apresentou os melhores resultados aos 7 dias (diabético = $1,55 \pm 0,04$) e aos 30 dias (saudável = $1,81 \pm 0,04$) ($p < 0.001$) (Figura 36).

Figura 35. A-F. Expressão relativa de Opn com dados organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 36. Expressão relativa de Opn quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.4.5 Receptor ativador de fator nuclear kappa-B (Rank)

A expressão relativa de Receptor ativador do fator nuclear kappa-B (Rank) em função do tempo não demonstrou diferença estatisticamente significantes entre 7 ($0,86 \pm 0,02$) e 30 ($0,84 \pm 0,02$) dias ($p=0,169$) (Figura 37 A). O grupo saudável ($1,18 \pm 0,02$) apresentou maior expressão relativa de Rank quando comparado ao diabético ($0,52 \pm 0,02$) (dados em função da condição sistêmica) ($p<0,001$) (Figura 37 B). Ao considerar a superfície do implante, os grupos DAA ($1,02 \pm 0,03$) e NANO ($1,02 \pm 0,03$) exibiram maior expressão relativa de Rank em relação ao grupo LISA ($0,51 \pm 0,03$) (dados em função da superfície do implante) ($p<0,001$) (Figura 37 C). Comparando tempo e condição sistêmica, o grupo saudável 30 dias ($1,38 \pm 0,03$) apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos demais grupos experimentais (saudável 7 dias = $0,98 \pm 0,03$, diabético 7 dias = $0,75 \pm 0,03$, diabético 30 dias = $0,30 \pm 0,03$) ($p<0,001$) (Figura 37 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante, evidenciou uma superioridade dos grupo NANO 7 dias ($1,45 \pm 0,04$) e DAA 30 dias ($1,39 \pm 0,04$) em relação aos demais (LISA 7 dias = $0,50 \pm 0,04$, DAA 7 dias = $0,65 \pm 0,04$, LISA 30 dias = $0,53 \pm 0,04$, NANO 30 dias = $0,06 \pm 0,04$) ($p<0,001$) (Figura 37 E). Quando a expressão relativa de Rank foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo DAA saudável ($1,59 \pm 0,04$) apresentou diferença estatisticamente

significante ($p < 0.001$) (Figura 37 F). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que a superfície NANO apresentou os melhores resultados aos 7 dias (diabético = $1,84 \pm 0,06$) ($p < 0.001$) (Figura 38).

Figura 37. A-F. Expressão relativa de Rank com dados organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 38. Expressão relativa de Rank quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.4.6 Receptor ativador do fator nuclear kappa ligante (Rankl)

A expressão relativa do Receptor ativador do fator nuclear kappa ligante (Rankl) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significantes entre 7 ($0,66 \pm 0,05$) e 30 ($0,80 \pm 0,05$) dias ($p < 0,001$) (Figura 39 A). O grupo saudável ($1,06 \pm 0,05$) apresentou maior expressão relativa de Rankl quando comparado ao diabético ($0,39 \pm 0,05$) (dados em função da condição sistêmica) ($p < 0,001$) (Figura 39 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo DAA ($0,98 \pm 0,06$) exibiu maior expressão relativa de Rankl em relação aos grupos LISA ($0,48 \pm 0,06$) e NANO ($0,72 \pm 0,06$) (dados em função da superfície do implante) ($p < 0,001$) (Figura 39 C). Comparando tempo e condição sistêmica, o grupo saudável 30 dias ($1,24 \pm 0,08$) apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos demais grupos experimentais (saudável 7 dias = $0,89 \pm 0,08$, diabético 7 dias = $0,42 \pm 0,08$, diabético 30 dias = $0,37 \pm 0,08$) ($p < 0,001$) (Figura 39 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante, evidenciou uma superioridade do grupo DAA 30 dias ($1,40 \pm 0,09$) em relação aos demais (LISA 7 dias = $0,50 \pm 0,09$, DAA 7 dias = $0,57 \pm 0,09$, NANO 7 dias = $0,90 \pm 0,09$, LISA 30 dias = $0,47 \pm 0,09$, NANO 30 dias = $0,54 \pm 0,09$) ($p < 0,001$) (Figura 39 E). Quando a expressão relativa de Rankl foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo DAA saudável ($1,50 \pm 0,09$) apresentou diferença

estatisticamente significativa ($p < 0.013$) (Figura 39 F). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que o grupo diabético NANO 7 dias ($1,11 \pm 0,13$) se equivaliu ao grupo saudável DAA 7 dias ($0,97 \pm 0,13$) (Figura 40).

Figura 39. A-F. Expressão relativa de Rankl com dados organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 40. Expressão relativa de Rankl quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significativa entre os grupos.

4.4.7 Osteoprotegerina (Opg)

A expressão relativa de Osteoprotegerina (Opg) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significantes entre 7 ($0,67 \pm 0,05$) e 30 ($0,87 \pm 0,05$) dias ($p < 0,011$) (Figura 41 A). O grupo saudável ($0,92 \pm 0,05$) apresentou maior expressão relativa de Opg quando comparado ao diabético ($0,63 \pm 0,05$) (dados em função da condição sistêmica) ($p < 0,011$) (Figura 41 B). Ao considerar a superfície do implante, o grupo DAA ($1,00 \pm 0,07$) exibiu maior expressão relativa de Opg em relação aos grupos LISA ($0,51 \pm 0,07$) e NANO ($0,81 \pm 0,07$) (dados em função da superfície do implante) ($p < 0,011$) (Figura 41 C). Comparando tempo e condição sistêmica, os grupos saudável 7 ($0,89 \pm 0,08$) e 30 dias ($0,94 \pm 0,08$) apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação aos demais grupos experimentais (diabético 7 dias = $0,45 \pm 0,08$, diabético 30 dias = $0,81 \pm 0,08$) ($p < 0,027$) (Figura 41 D). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante, evidenciou uma superioridade do grupo DAA 30 dias ($1,28 \pm 0,10$) em relação aos demais (LISA 7 dias = $0,50 \pm 0,10$, DAA 7 dias = $0,72 \pm 0,10$, NANO 7 dias = $0,79 \pm 0,10$, LISA 30 dias = $0,51 \pm 0,10$, NANO 30 dias = $0,84 \pm 0,10$) ($p < 0,011$) (Figura 41 E). Quando a expressão relativa de Opg foi avaliada em função da condição sistêmica e da superfície, o grupo DAA saudável ($1,28 \pm 0,10$) apresentou diferenças estatisticamente significantes

($p < 0.011$) (Figura 41 F). Avaliando todos os fatores (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície), os resultados evidenciaram que o grupo diabético NANO 7 dias ($0,99 \pm 0,14$) se equivaleu ao grupo saudável DAA 7 dias ($1,08 \pm 0,14$) (Figura 42).

Figura 41. A-F. Expressão relativa de Opg organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função da condição sistêmica (B). Em função da superfície do implante (C). Em função do tempo e da condição sistêmica (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da condição sistêmica e da superfície (F). Letras idênticas indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 42. Expressão relativa de Opg quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, condição sistêmica e tratamento de superfície) (média e IC 95%). Letras idênticas indicam que não há diferença significante entre os grupos.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas, uma atenção significativa foi destinada à melhoria da biocompatibilidade entre o hospedeiro e o implante e as respostas biomecânicas por meio do *design* do implante. Dentre as alterações de *design*, o parâmetro mais avaliado são as modificações na superfície, pois é a primeira parte do implante a interagir com os biofluidos do hospedeiro, tendo o potencial de alterar significativamente a interação entre osso e implante (Albrektsson and Wennerberg 2004a; 2004b; Berglundh et al. 2007; Buser et al. 2004; Coelho et al. 2009; Mendes et al. 2007). Mudanças na topografia da superfície podem afetar as interações célula-matriz-substrato por meio de: a) adsorção de proteínas alteradas, formação de coágulos de fibrina e expressão da integrina, b) a própria topografia e/ou c) mudanças na molhabilidade/energia da superfície (Boyan et al. 2003; de Oliveira and Nanci 2004). De fato, tais aspectos têm sido implicados como principais mecanismos para o controle da adesão celular seletiva, sinalização, diferenciação e eventual formação de tecido em superfícies de biomateriais (Boyan et al. 2003; de Oliveira and Nanci 2004).

O presente estudo avaliou, utilizando ratos diabéticos (como um modelo de reparação óssea deficiente) e ratos saudáveis (controle com reparação óssea normal) uma nova superfície de implantes recoberta com nanopartículas de hidroxiapatita (NANO HA), por meio de: análiseS microtomográfica (micro-CT), histomorfométrica, nanomecânica e da avaliação da expressão gênica de genes marcadores do metabolismo ósseo.

A literatura é bem estabelecida no que diz respeito aos malefícios causados por condições de saúde metabolicamente comprometidas, como o diabetes mellitus (DM), durante os eventos básicos da osseointegração: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (Giglio et al. 2000; King et al. 2016; Miyata et al. 1997; Nevins et al. 1998). Esses estudos mostraram que o diabetes leva a um menor contato osso-implante e menor densidade óssea (Johansson and Albrektsson 1987; Sennerby et al. 1992). No presente estudo, os valores de glicemia dos grupos saudável (cirurgia: $89,55 \pm 8,88$ e eutanásia: $92,19 \pm 9,67$) e diabético (cirurgia: $499,88 \pm 62,27$ e eutanásia: $544,63 \pm 57,07$) estão de acordo com os achados da literatura (Margonar et al. 2003). Margonar et al., 2003 utilizaram o mesmo parâmetro para definir o modelo diabético (níveis de glicose plasmática igual ou acima de 300 mg/dL) e sugeriram que níveis glicêmicos mais elevados poderiam levar a alterações mais severas na osseointegração. O osso recém-formado ao redor dos implantes foi relatado imaturo e menos organizado em ratos diabéticos descontrolados do que em controles não diabéticos, sugerindo diferenças qualitativas no osso neoformado (Nevins et al. 1998).

Com o objetivo de melhorar a taxa e a extensão da osseointegração em cenários desafiadores, tal como DM, foram sugeridas mudanças na superfície dos implantes (Burgos et al. 2008; Cochran et al. 1998). No entanto, estudos comparando seus benefícios potenciais ainda não são claros quando usados em um modelo de DM (Jiang et al. 2017). No presente estudo, o remodelamento ósseo pareceu estar em um estágio mais avançado em torno de implantes com superfícies tratadas e em menor grau na superfície lisa. Esses resultados sugerem que a remodelação óssea pode se dar de forma mais precoce em torno de superfícies modificadas.

A estruturação de topografia de superfície em nível de micro e nanoescala foi desenvolvida com o objetivo de promover a formação óssea adjacente ou em contato com as superfícies dos implantes. Além disso, superfícies de titânio comercialmente puro micro e nanoestruturadas podem promover uma melhor adesão, função e formação de nódulos ósseos de osteoblastos, além de favorecer um maior contato osso-implante (Boyan et al. 2003; de Oliveira and Nanci 2004; Huang et al. 2005).

Zuo et al., 2013 também revelaram que mudanças na topografia da superfície, particularmente a nanotopografia, desempenharam um papel importante na adesão e proliferação celular (Zuo et al. 2013). Estudos anteriores descreveram que superfícies de biomateriais com rugosidade em microescala podem diminuir a proliferação de osteoblastos, mas a topografia em nanoescala tende a ajudar nos processos de proliferação (Gittens et al. 2013; Kubo et al. 2009; Zhuang et al. 2014). No presente estudo, em um modelo de rato diabético, a superfície de implante revestida com nano-hidroxiapatita foi superior às superfícies DAA e LISA, sugerindo que a adição de partículas de nano-hidroxiapatita influenciou significativamente no processo de osseointegração.

A avaliação em 3D com a utilização do micro-CT tem recebido considerável atenção nos últimos anos pois facilita a observação e a quantificação da formação óssea ao redor de implantes ou substitutos ósseos em um plano tridimensional (Sarve et al. 2011). Técnicas de aquisição de imagem 3D de alta resolução, como micro-CT, medem diretamente a microarquitetura óssea. No presente estudo, a % IS/TS mostrou que o revestimento com NANO HA apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado às superfícies LISA e DAA, independentemente do tempo e da condição sistêmica. Essa evidência pode sugerir que a nova superfície de implante pode compensar as limitações de um modelo de reparo ósseo deficiente. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram que modificações na superfície em escala nanométrica foram capazes de inibir o efeito de altas concentrações de glicose (Ajami et al. 2016; Ajami et al. 2014). Além disso,

superfícies micro/nanoestruturadas possuem biocompatibilidade favorável na melhoria da proliferação e diferenciação de osteoblastos na presença da hiperglicemia (Jiang et al. 2017).

A análise micro-CT de BV/TV (%), BS/BV (mm) e Po.To (%) demonstraram valores mais elevados, padrões ósseos mais organizados e maiores densidades volumétricas para o grupo NANO em todos os tempos avaliados e independentemente da condição sistêmica quando comparado aos outros grupos experimentais, com exceção do BS/BV (30 dias rato saudável e 7 e 30 dias rato diabético), sugerindo uma resposta óssea mais favorável nestes grupos. Já os resultados da Tb.Sp (%) revelaram diferenças estatísticas favorecendo o grupo diabético NANO aos 7 e 30 dias. Os resultados do presente estudo concordam com Ajami et al., 2014 que pesquisaram a osseointegração em ratos euglicêmicos e hiperglicêmicos utilizando análise de micro-CT e histologia e concluíram que a integração comprometida do implante na hiperglicemia é anulada pela adição de características nanotopográficas a uma superfície subjacente de implantes microtopograficamente complexa (Ajami et al. 2014).

A quantidade de osso que envolve a superfície dos implantes diferiu nos diferentes tratamentos superficiais, condição sistêmica e tempo. Verificou-se que a formação de osso na interface osso-implante foi superior em grupos NANO, independentemente da condição sistêmica e tempo. As imagens reconstruídas em 3D demonstram o estado da formação óssea trabecular na superfície do implante, fornecendo informações adicionais de perspectivas qualitativas e quantitativas.

O desenvolvimento de uma topografia de superfície em microescala, como implantes com duplo ácido-ácido (DAA), aumentaram a formação óssea junto à superfície do implante quando comparada às superfícies sem tratamento (LISA) (Coelho et al. 2011a; Coelho et al. 2015; Khang et al. 2001). Além disso, o surgimento de superfícies quimicamente/topograficamente complexas, como implantes revestidos com nano-hidroxiapatita (NANO), proporcionaram um arranjo mais adequado que mimetiza melhor a organização natural do tecido ósseo e facilita a interação com biomoléculas dos tecidos e comunicação célula-célula durante o processo de cicatrização (Hayashi et al. 2012; Tomsia et al. 2013; Webster and Ahn 2007). A partir da análise histomorfométrica, a superfície NANO apresentou maiores % BIC e % BAFO quando comparada com LISA e DAA (dados avaliados em função da superfície do implante). Além disso, por um mecanismo de cicatrização específico do implante, aos 30 dias a superfície NANO apresentou maiores % BIC e % BAFO do que as superfícies LISA e DAA, com diferenças estatisticamente significantes (avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante). Os achados da literatura apoiam esta evidência por meio de estudos anteriores em animais que demonstraram superfícies

complexas NANO superando superfícies de microtopografia em indivíduos metabolicamente comprometidos (Ajami et al. 2016; Ajami et al. 2014; Schlegel et al. 2013).

Os resultados apresentados por superfícies de implantes complexas em cenários desafiadores, como ossos de baixa densidade, motivaram o seu uso em casos de comprometimento sistêmico que afetam o metabolismo ósseo e a osseointegração (Coelho et al. 2014b). A nanoindentação do osso ao redor dos implantes tem o potencial de elucidar os aspectos qualitativos da osseointegração (Jimbo et al. 2012a). No presente estudo, os dados avaliados em função do tempo mostraram a superioridade de ME e D no tempo experimental de 30 dias em comparação a 7 dias. Quando os dados foram avaliados em função da superfície do implante, o grupo NANO apresentou maior ME e D que DAA e LISA. Além disso, aos 30 dias, a superfície NANO apresentou maiores valores de ME e D quando comparada às superfícies LISA e DAA, com diferenças estatisticamente significantes (avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante). Achados da literatura comparando o uso de superfícies NANO e DAA confirmaram a superioridade do primeiro em relação aos parâmetros histológicos (Coelho et al. 2011b; Coelho et al. 2014b).

A expressão gênica de Runx2, Alp, Oc e Opn, genes marcadores do metabolismo ósseo, foi utilizada para avaliar o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico. Como amplamente relatado, Runx2 é o principal fator de transcrição que inicia a formação óssea (Lian et al. 2006) e a diferenciação de osteoblastos (Komori and Kishimoto 1998). Sabe-se também que a Alp é um fator regulador da mineralização da matriz e é expresso nos estágios iniciais da osteogênese (Hoemann et al. 2009). Oc é um gene específico de osteoblastos que regula a mineralização óssea (Ducy et al. 1996). Opn é geralmente considerada como uma proteína da matriz extracelular multifuncional envolvida na adesão e migração celular e na regulação da deposição mineral (Denhardt et al. 2001; Giachelli and Steitz 2000). 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 previne a ligação do Rankl ao Rank, que está presente na membrana dos osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea (Khosla 2001).

No presente estudo, observou-se uma redução na expressão de Opg no tempo de 7 dias do grupo NANO saudável. Este resultado sugere que as células osteoblásticas do revestimento NANO-HA podem aumentar a atividade osteoclástica. Entretanto, isso não deve ser interpretado como um possível aumento na reabsorção óssea, uma vez que várias citocinas liberadas pelas células osteoblásticas exercem funções regulatórias sobre os osteoclastos (Petri et al. 2010). Provavelmente, a atividade de reabsorção dos osteoclastos foi suprimida

por altas concentrações de Opg, em nível molecular, e a Opg por sua vez, diminuiu a expressão de genes osteocláticos relacionados à reabsorção óssea. Esse resultado está de acordo com o estudo realizado por Fu et al., 2013 (Fu et al. 2013).

Existem evidências que sugerem que altos níveis de glicose no sangue podem levar à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) irreversíveis que podem se ligar ao receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) e podem se acumular nos fibroblastos (Lalla et al. 2000). Quando isso ocorre, pode haver uma maior destruição do tecido conjuntivo e do osso, devido à diminuição da síntese de colágeno e aumento dos mediadores inflamatórios (Lalla et al. 2000). He et al., 2004 sugeriram que o diabetes pode exibir mais reabsorção óssea devido à apoptose prolongada dos osteoblastos e à diminuição na formação óssea (He et al. 2004). No presente estudo, alguns resultados indicaram que a superfície NANO-HA pode ser menos afetada pelos efeitos adversos resultantes da hiperglicemia: os níveis de Runx2 (diabético NANO 7 dias: 1,78), Alp (diabético NANO 7 dias: 2,57), Oc (diabético NANO 7 dias: 3,38) Opn (diabético NANO 7 dias: 1,55) sugerem um aumento da proliferação de osteoblastos, principalmente nos estágios iniciais da osseointegração. Além disso, a cascata de mineralização altamente ativa do osso interfacial em torno dos implantes revestidos com NANO HA pode ser explicada a partir de uma perspectiva genética. Tem sido relatado que a expressão de Alp no osso ao redor de implantes revestidos com NANO HA foi significativamente maior do que nos controles sem tratamento (Jimbo et al. 2011). Uma vez que uma alta atividade de Alp aumenta a expressão da osteopontina, que é conhecida por ser um fator coesivo para a mineralização, podemos sugerir que o revestimento de NANO HA foi parcialmente responsável pelo aumento das propriedades ósseas.

A importância da topografia e da química da superfície do implante têm sido amplamente discutidas (Albrektsson and Wennerberg 2004a; Berglundh et al. 2007; Boyan et al. 2003; Coelho et al. 2014a; Jiang et al. 2017; Martinez et al. 2018). O presente estudo demonstrou, em modelo *in vivo*, por meio de parâmetros microtomográficos, histológicos, de nanoindentação e de expressão gênica, que o revestimento com NANO HA promoveu um aumento significativo da regulação do processo de mineralização, independentemente da condição sistêmica e do tempo, sugerindo que modificações de superfície bioativas em nanoescala podem agir como uma compensação para a influência negativa do DM na osseointegração.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados no presente estudo, pudemos concluir que:

- a) os implantes recobertos com NANO-hidroxiapatita apresentaram resultados microtomográficos, histológicos, de nanodureza e de expressão gênica superiores em promover formação de novo osso em um modelo de cicatrização deficiente;
- b) a superfície de NANO-hidroxiapatita apresentou potencial para compensar a cicatrização óssea prejudicada que ocorre em indivíduos diabéticos. Os presentes resultados sugerem que esta superfície seja testada em estudos clínicos controlados em humanos em modelos ósseos desafiadores, avaliando se os achados em animais resultarão em diferenças clínicas em termos de sucesso e/ou sobrevivência de implantes.

7 Referências

7 REFERÊNCIAS

- Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark PI, Jemt T. 1990. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 5(4):347-359.
- Ajami E, Bell S, Liddell RS, Davies JE. 2016. Early bone anchorage to micro- and nano-topographically complex implant surfaces in hyperglycemia. *Acta Biomater*. 39:169-179.
- Ajami E, Mahno E, Mendes VC, Bell S, Moineddin R, Davies JE. 2014. Bone healing and the effect of implant surface topography on osteoconduction in hyperglycemia. *Acta Biomater*. 10(1):394-405.
- Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. 1981. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 52(2):155-170.
- Albrektsson T, Johansson C. 2001. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 10 Suppl 2:S96-101.
- Albrektsson T, Wennerberg A. 2004a. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont*. 17(5):536-543.
- Albrektsson T, Wennerberg A. 2004b. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont*. 17(5):544-564.
- Anchieta RB, Baldassarri M, Guastaldi F, Tovar N, Janal MN, Gottlow J, Dard M, Jimbo R, Coelho PG. 2014. Mechanical property assessment of bone healing around a titanium-zirconium alloy dental implant. *Clin Implant Dent Relat Res*. 16(6):913-919.
- Anselme K, Biggerelle M. 2005. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomater*. 1(2):211-222.
- Baldassarri M, Bonfante E, Suzuki M, Marin C, Granato R, Tovar N, Coelho PG. 2012. Mechanical properties of human bone surrounding plateau root form implants retrieved after 0.3-24 years of function. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 100(7):2015-2021.
- Battula S, Lee JW, Wen HB, Papanicolaou S, Collins M, Romanos GE. 2015. Evaluation of different implant designs in a ligature-induced peri-implantitis model: A canine study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 30(3):534-545.

- Berglundh T, Abrahamsson I, Albouy JP, Lindhe J. 2007. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 18(2):147-152.
- 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.
- Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. 1996. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials.* 17(2):137-146.
- Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, Schwartz Z. 2003. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater.* 6:22-27.
- Braceras I, De Maeztu MA, Alava JI, Gay-Escoda C. 2009. In vivo low-density bone apposition on different implant surface materials. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 38(3):274-278.
- Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. 1969. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 3(2):81-100.
- Brunette D, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. 2001. *Titanium in medicine.* Berlin.
- Burgos PM, Rasmusson L, Meirelles L, Sennerby L. 2008. Early bone tissue responses to turned and oxidized implants in the rabbit tibia. *Clin Implant Dent Relat Res.* 10(3):181-190.
- Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. 2004. Enhanced bone apposition to a chemically modified titanium surface. *J Dent Res.* 83(7):529-533.
- Chambrone L, Chambrone LA, Lima LA. 2010. Effects of occlusal overload on peri-implant tissue health: A systematic review of animal-model studies. *J Periodontol.* 81(10):1367-1378.
- Chambrone L, Preshaw PM, Ferreira JD, Rodrigues JA, Cassoni A, Shibli JA. 2014. Effects of tobacco smoking on the survival rate of dental implants placed in areas of maxillary sinus floor augmentation: A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 25(4):408-416.

- Chehroudi B, Gould TR, Brunette DM. 1989. Effects of a grooved titanium-coated implant surface on epithelial cell behavior in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res.* 23(9):1067-1085.
- Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. 1998. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res.* 40(1):1-11.
- Coelho PG, Bonfante EA, Pessoa RS, Marin C, Granato R, Giro G, Witek L, Suzuki M. 2011a. Characterization of five different implant surfaces and their effect on osseointegration: A study in dogs. *J Periodontol.* 82(5):742-750.
- Coelho PG, Freire JN, Granato R, Marin C, Bonfante EA, Gil JN, Chuang SK, Suzuki M. 2011b. Bone mineral apposition rates at early implantation times around differently prepared titanium surfaces: A study in beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 26(1):63-69.
- Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G, Thompson VP, Lemons JE. 2009. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 88(2):579-596.
- Coelho PG, Jimbo R, Tovar N, Bonfante EA. 2015. Osseointegration: Hierarchical designing encompassing the micrometer, micrometer, and nanometer length scales. *Dent Mater.* 31(1):37-52.
- Coelho PG, Marin C, Granato R, Giro G, Suzuki M, Bonfante EA. 2012. Biomechanical and histologic evaluation of non-washed resorbable blasting media and alumina-blasted/acid-etched surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 23(1):132-135.
- Coelho PG, Takayama T, Yoo D, Jimbo R, Karunagaran S, Tovar N, Janal MN, Yamano S. 2014a. Nanometer-scale features on micrometer-scale surface texturing: A bone histological, gene expression, and nanomechanical study. *Bone.* 65:25-32.
- Coelho PG, Teixeira HS, Marin C, Witek L, Tovar N, Janal MN, Jimbo R. 2014b. The in vivo effect of p-15 coating on early osseointegration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 102(3):430-440.
- Davies JE. 1998. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* 11(5):391-401.
- De la Rosa M, Rodriguez A, Sierra K, Mendoza G, Chambrone L. 2013. Predictors of peri-implant bone loss during long-term maintenance of patients treated with 10-mm implants and single crown restorations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 28(3):798-802.

- de Oliveira PT, Nanci A. 2004. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 25(3):403-413.
- Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. 2001. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41:723-749.
- Dinato JC. 2004. Implantes osseointegrados: Cirurgia e prótese. São Paulo.
- Doerner M, Nix W. 1986. A method for interpreting the data from depth- sensing indentation instruments. *J Mater Res* 1:601 - 609.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C et al. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 382(6590):448-452.
- Elias CN, Meirelles L. 2010. Improving osseointegration of dental implants. *Expert Rev Med Devices*. 7(2):241-256.
- Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A. 2004. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 19(5):659-666.
- Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. 1991. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 62(2):123-131.
- Esposito M, Grusovin MG, Willings M, Coulthard P, Worthington HV. 2007. The effectiveness of immediate, early, and conventional loading of dental implants: A cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 22(6):893-904.
- Expert Committee on the D, Classification of Diabetes M. 2000. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 23 Suppl 1:S4-19.
- Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jasion G, Kleerekoper M. 1989. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res*. 4(1):3-11.
- Frantzis TG, Reeve CM, Brown AL, Jr. 1971. The ultrastructure of capillary basement membranes in the attached gingiva of diabetic and nondiabetic patients with periodontal disease. *J Periodontol*. 42(7):406-411.

- Fu YX, Gu JH, Zhang YR, Tong XS, Zhao HY, Yuan Y, Liu XZ, Bian JC, Liu ZP. 2013. Osteoprotegerin influences the bone resorption activity of osteoclasts. *Int J Mol Med*. 31(6):1411-1417.
- Giachelli CM, Steitz S. 2000. Osteopontin: A versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol*. 19(7):615-622.
- Giglio MJ, Giannunzio G, Olmedo D, Guglielmotti MB. 2000. Histomorphometric study of bone healing around laminar implants in experimental diabetes. *Implant Dent*. 9(2):143-149.
- Gil LF, Sarendranath A, Neiva R, Marao HF, Tovar N, Bonfante EA, Janal MN, Castellano A, Coelho PG. 2017. Bone healing around dental implants: Simplified vs conventional drilling protocols at speed of 400 rpm. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 32(2):329-336.
- Gittens RA, McLachlan T, Olivares-Navarrete R, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD. 2011. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*. 32(13):3395-3403.
- Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Cheng A, Anderson DM, McLachlan T, Stephan I, Geis-Gerstorfer J, Sandhage KH, Fedorov AG, Rupp F et al. 2013. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomater*. 9(4):6268-6277.
- Gonzalez-Garcia R, Monje F. 2013. The reliability of cone-beam computed tomography to assess bone density at dental implant recipient sites: A histomorphometric analysis by micro-ct. *Clin Oral Implants Res*. 24(8):871-879.
- Gooch HL, Hale JE, Fujioka H, Balian G, Hurwitz SR. 2000. Alterations of cartilage and collagen expression during fracture healing in experimental diabetes. *Connect Tissue Res*. 41(2):81-91.
- Goodman WG, Hori MT. 1984. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes*. 33(9):825-831.
- Harkness JE, Wagner JE. 1993. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. São Paulo: Roca.
- Hayashi M, Jimbo R, Lindh L, Sotres J, Sawase T, Mustafa K, Andersson M, Wennerberg A. 2012. In vitro characterization and osteoblast responses to nanostructured photocatalytic tio2 coated surfaces. *Acta Biomater*. 8(6):2411-2416.

- He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. 2004. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology*. 145(1):447-452.
- Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. 2009. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris)*. 57(4):318-323.
- Hoffler CE, Guo XE, Zysset PK, Goldstein SA. 2005. An application of nanoindentation technique to measure bone tissue lamellae properties. *J Biomech Eng*. 127(7):1046-1053.
- Hoffler CE, Moore KE, Kozloff K, Zysset PK, Brown MB, Goldstein SA. 2000. Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli. *Bone*. 26(6):603-609.
- Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Albandar JM, Hall J, Wikesjo UM. 2005. Bone formation at titanium porous oxide (titanium) oral implants in type iv bone. *Clin Oral Implants Res*. 16(1):105-111.
- Iyama S, Takeshita F, Ayukawa Y, Kido MA, Suetsugu T, Tanaka T. 1997. A study of the regional distribution of bone formed around hydroxyapatite implants in the tibiae of streptozotocin-induced diabetic rats using multiple fluorescent labeling and confocal laser scanning microscopy. *J Periodontol*. 68(12):1169-1175.
- Javed F, Almas K, Crespi R, Romanos GE. 2011. Implant surface morphology and primary stability: Is there a connection? *Implant Dent*. 20(1):40-46.
- Jemt T, Lekholm U. 1993. Oral implant treatment in posterior partially edentulous jaws: A 5-year follow-up report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 8(6):635-640.
- Jemt T, Lekholm U, Adell R. 1989. Osseointegrated implants in the treatment of partially edentulous patients: A preliminary study on 876 consecutively placed fixtures. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 4(3):211-217.
- Jiang H, Ma X, Zhou W, Dong K, Rausch-Fan X, Liu S, Li S. 2017. The effects of hierarchical micro/nano-structured titanium surface on osteoblast proliferation and differentiation under diabetic conditions. *Implant Dent*. 26(2):263-269.
- Jiang P, Liang J, Song R, Zhang Y, Ren L, Zhang L, Tang P, Lin C. 2015. Effect of octacalcium-phosphate-modified micro/nanostructured titanium surfaces on osteoblast response. *ACS Appl Mater Interfaces*. 7(26):14384-14396.

- Jimbo R, Anchietà R, Baldassarri M, Granato R, Marin C, Teixeira HS, Tovar N, Vandeweghe S, Janal MN, Coelho PG. 2013. Histomorphometry and bone mechanical property evolution around different implant systems at early healing stages: An experimental study in dogs. *Implant Dent*. 22(6):596-603.
- Jimbo R, Coelho PG, Bryington M, Baldassarri M, Tovar N, Currie F, Hayashi M, Janal MN, Andersson M, Ono D et al. 2012a. Nano hydroxyapatite-coated implants improve bone nanomechanical properties. *J Dent Res*. 91(12):1172-1177.
- Jimbo R, Sotres J, Johansson C, Breiding K, Currie F, Wennerberg A. 2012b. The biological response to three different nanostructures applied on smooth implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 23(6):706-712.
- Jimbo R, Xue Y, Hayashi M, Schwartz-Filho HO, Andersson M, Mustafa K, Wennerberg A. 2011. Genetic responses to nanostructured calcium-phosphate-coated implants. *J Dent Res*. 90(12):1422-1427.
- Jinno Y, Jimbo R, Tovar N, Teixeira HS, Witek L, Coelho PG. 2017. In vivo evaluation of dual acid-etched and grit-blasted/acid-etched implants with identical macrogeometry in high-density bone. *Implant Dent*. 26(6):815-819.
- Johansson C, Albrektsson T. 1987. Integration of screw implants in the rabbit: A 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2(2):69-75.
- Johansson CB, Gretzer C, Jimbo R, Mattisson I, Ahlberg E. 2012. Enhanced implant integration with hierarchically structured implants: A pilot study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 23(8):943-953.
- Kayal RA, Tsatsas D, Bauer MA, Allen B, Al-Sebaei MO, Kakar S, Leone CW, Morgan EF, Gerstenfeld LC, Einhorn TA et al. 2007. Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. *J Bone Miner Res*. 22(4):560-568.
- Khang W, Feldman S, Hawley CE, Gunsolley J. 2001. A multi-center study comparing dual acid-etched and machined-surfaced implants in various bone qualities. *J Periodontol*. 72(10):1384-1390.
- Khosla S. 2001. Minireview: The opg/rankl/rank system. *Endocrinology*. 142(12):5050-5055.
- King H, Aubert RE, Herman WH. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 21(9):1414-1431.

- King S, Klineberg I, Levinger I, Brennan-Speranza TC. 2016. The effect of hyperglycaemia on osseointegration: A review of animal models of diabetes mellitus and titanium implant placement. *Arch Osteoporos.* 11(1):29.
- Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A. 1997. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 8(6):442-447.
- Komori T, Kishimoto T. 1998. Cbfa1 in bone development. *Curr Opin Genet Dev.* 8(4):494-499.
- Kubo K, Tsukimura N, Iwasa F, Ueno T, Saruwatari L, Aita H, Chiou WA, Ogawa T. 2009. Cellular behavior on tio2 nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model. *Biomaterials.* 30(29):5319-5329.
- Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. 2000. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: Potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontol* 2000. 23:50-62.
- Lang NP, Zitzmann NU, Working Group 3 of the VEWoP. 2012. Clinical research in implant dentistry: Evaluation of implant-supported restorations, aesthetic and patient-reported outcomes. *J Clin Periodontol.* 39 Suppl 12:133-138.
- Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. 2007. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 23(7):844-854.
- Lee KL, Sobieraj M, Baldassarri M, Gupta N, Pinisetty D, Janal MN, Tovar N, Coelho PG. 2013. The effects of loading conditions and specimen environment on the nanomechanical response of canine cortical bone. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 33(8):4582-4586.
- Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Hassan MQ, Gaur T, Lengner CJ, Young DW. 2006. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 7(1-2):1-16.
- Liu Y, de Groot K, Hunziker EB. 2004. Osteoinductive implants: The mise-en-scene for drug-bearing biomimetic coatings. *Ann Biomed Eng.* 32(3):398-406.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods.* 25(4):402-408.

- Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. 2003. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 144(1):346-352.
- Manna S, Donnell AM, Kaval N, Al-Rjoub MF, Augsburger JJ, Banerjee RK. 2018. Improved design and characterization of plga/pla-coated chitosan based micro-implants for controlled release of hydrophilic drugs. *Int J Pharm*. 547(1-2):122-132.
- Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba j R, Marcantonio j E. 2003. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: A study in rabbits. *Implant Dent*. 12(4):333-339.
- Marin-Pareja N, Salvagni E, Guillem-Marti J, Aparicio C, Ginebra MP. 2014. Collagen-functionalised titanium surfaces for biological sealing of dental implants: Effect of immobilisation process on fibroblasts response. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 122:601-610.
- Marinho VC, Celletti R, Bracchetti G, Petrone G, Minkin C, Piattelli A. 2003. Sandblasted and acid-etched dental implants: A histologic study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 18(1):75-81.
- Martin-Badosa E, Amblard D, Nuzzo S, Elmoutaouakkil A, Vico L, Peyrin F. 2003. Excised bone structures in mice: Imaging at three-dimensional synchrotron radiation micro ct. *Radiology*. 229(3):921-928.
- Martinez EF, Ishikawa GJ, de Lemos AB, Barbosa Bezerra FJ, Sperandio M, Napimoga MH. 2018. Evaluation of a titanium surface treated with hydroxyapatite nanocrystals on osteoblastic cell behavior: An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 33(3):597-602.
- McCracken M, Lemons JE, Rahemtulla F, Prince CW, Feldman D. 2000. Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 15(3):345-354.
- McMahon MM, Bistrrian BR. 1995. Host defenses and susceptibility to infection in patients with diabetes mellitus. *Infect Dis Clin North Am*. 9(1):1-9.
- Meirelles L, Arvidsson A, Albrektsson T, Wennerberg A. 2007. Increased bone formation to unstable nano rough titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 18(3):326-332.
- Meirelles L, Arvidsson A, Andersson M, Kjellin P, Albrektsson T, Wennerberg A. 2008. Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. *J Biomed Mater Res A*. 87(2):299-307.

- Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. 2007. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials*. 28(32):4748-4755.
- Michaeli E, Weinberg I, Nahlieli O. 2009. Dental implants in the diabetic patient: Systemic and rehabilitative considerations. *Quintessence Int*. 40(8):639-645.
- Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, Taketomi S. 1997. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol*. 8(2):260-270.
- Moraschini V, Poubel LA, Ferreira VF, Barboza Edos S. 2015. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 44(3):377-388.
- Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. 1998. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 13(5):620-629.
- Novaes AB, Jr., de Souza SL, de Barros RR, Pereira KK, Iezzi G, Piattelli A. 2010. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J*. 21(6):471-481.
- Oates TW, Huynh-Ba G, Vargas A, Alexander P, Feine J. 2013. A critical review of diabetes, glycemic control, and dental implant therapy. *Clin Oral Implants Res*. 24(2):117-127.
- Oliver RC, Tervonen T. 1993. Periodontitis and tooth loss: Comparing diabetics with the general population. *J Am Dent Assoc*. 124(12):71-76.
- Park HS, Lee YJ, Jeong SH, Kwon TG. 2008. Density of the alveolar and basal bones of the maxilla and the mandible. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 133(1):30-37.
- Park YS, Yi KY, Lee IS, Han CH, Jung YC. 2005. The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 20(1):31-38.
- Petri AD, Teixeira LN, Crippa GE, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. 2010. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Braz Dent J*. 21(6):491-498.
- Pinholt EM. 2003. Branemark and iti dental implants in the human bone-grafted maxilla: A comparative evaluation. *Clin Oral Implants Res*. 14(5):584-592.

- Pjetursson BE, Tan K, Lang NP, Bragger U, Egger M, Zwahlen M. 2004. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (fpds) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res.* 15(6):625-642.
- Retzepi M, Donos N. 2010. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clin Oral Implants Res.* 21(7):673-681.
- Rothwell BR, Richard EL. 1984. Diabetes mellitus: Medical and dental considerations. *Spec Care Dentist.* 4(2):58-65.
- Safkan-Seppala B, Ainamo J. 1992. Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 19(1):24-29.
- Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. 2003. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes.* 52(6):1502-1510.
- Sarve H, Lindblad J, Borgefors G, Johansson CB. 2011. Extracting 3d information on bone remodeling in the proximity of titanium implants in srmuct image volumes. *Comput Methods Programs Biomed.* 102(1):25-34.
- Schlegel KA, Prechtel C, Most T, Seidl C, Lutz R, von Wilmsky C. 2013. Osseointegration of slactive implants in diabetic pigs. *Clin Oral Implants Res.* 24(2):128-134.
- Schulz MC, Korn P, Stadlinger B, Range U, Moller S, Becher J, Schnabelrauch M, Mai R, Scharnweber D, Eckelt U et al. 2014. Coating with artificial matrices from collagen and sulfated hyaluronan influences the osseointegration of dental implants. *J Mater Sci Mater Med.* 25(1):247-258.
- Sennerby L, Pagliani L, Petersson A, Verrocchi D, Volpe S, Andersson P. 2015. Two different implant designs and impact of related drilling protocols on primary stability in different bone densities: An in vitro comparison study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 30(3):564-568.
- Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE. 1992. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 7(1):62-71.
- Strietzel FP, Reichart PA, Kale A, Kulkarni M, Wegner B, Kuchler I. 2007. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 34(6):523-544.

- Takeshita F, Iyama S, Ayukawa Y, Kido MA, Murai K, Suetsugu T. 1997. The effects of diabetes on the interface between hydroxyapatite implants and bone in rat tibia. *J Periodontol*. 68(2):180-185.
- Tomsia AP, Lee JS, Wegst UG, Saiz E. 2013. Nanotechnology for dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 28(6):e535-546.
- Webster TJ, Ahn ES. 2007. Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 103:275-308.
- Weiss RE, Gorn AH, Nimni ME. 1981. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes*. 30(8):670-677.
- Wennerberg A, Albrektsson T. 2000. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 15(3):331-344.
- Wennerberg A, Albrektsson T. 2009. Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 20 Suppl 4:172-184.
- Wennerberg A, Albrektsson T. 2010. On implant surfaces: A review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 25(1):63-74.
- Wennerberg A, Albrektsson T. 2011. Current challenges in successful rehabilitation with oral implants. *J Oral Rehabil*. 38(4):286-294.
- Zhuang XM, Zhou B, Ouyang JL, Sun HP, Wu YL, Liu Q, Deng FL. 2014. Enhanced mc3t3-e1 preosteoblast response and bone formation on the addition of nano-needle and nano-porous features to microtopographical titanium surfaces. *Biomed Mater*. 9(4):045001.
- Zuo J, Huang X, Zhong X, Zhu B, Sun Q, Jin C, Quan H, Tang Z, Chen W. 2013. A comparative study of the influence of three pure titanium plates with different micro- and nanotopographic surfaces on preosteoblast behaviors. *J Biomed Mater Res A*. 101(11):3278-3284.

Anexo

ANEXO

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.693.53.0), intitulado "Avaliação Histomorfométrica e Imunoenzimática do Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Doença Periodontal Induzida, Utilizando Fármaco e Fonte de Luz de Baixo Custo. Estudo *in vivo* em ratos", de autoria de **Paula Gabriela Faciola Pessoa de Oliveira** e de **Sérgio Luis Scombatti de Souza**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 03.10.2012.

Colaboradores: Arthur Belém Novaes Junior;
Mário Taba Junior
Daniela Palioto
Marcio F.M. Grisi
Michel Messoria

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.693.53.0), entitled: "Avaliação Histomorfométrica e Imunoenzimática do Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Doença Periodontal Induzida, Utilizando Fármaco e Fonte de Luz de Baixo Custo. Estudo *in vivo* em ratos", by **Paula Gabriela Faciola Pessoa de Oliveira** and **Sérgio Luis Scombatti de Souza**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, October, 3 2012.

Ribeirão Preto, 17 de outubro de 2012.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Artigos

Artigo 1

Histological and nanomechanical properties of a new nanometric hydroxiapatite implant surface. AN *in vivo* study in diabetic rats.

Paula Gabriela Faciola Pessôa de Oliveira^{1,2}, Paulo Guilherme Coelho², Edmara Tatiely Pedroso Bergamo², Lukasz Witek², Cristine D'Almeida Borges¹, Fábio Bezerra¹, Arthur Belém Novaes Jr¹, Sérgio Luís Scombatti de Souza¹.

¹ Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

² Department of Biomaterials and Biomimetics, New York University, New York, NY, USA.

Correspondence address:

Sérgio Luís Scombatti de Souza

Departament of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology

School of Dentistry of Ribeirao Preto University of Sao Paulo

Av do Café, s/n. Zip: 14040-904 Ribeirao Preto - SP - Brazil

Tel: +55 16 3315-3980

Email: scombatti@forp.usp.br

Abstract

The aim of this study was to evaluate, in healthy and diabetic rats the response of a new topography implant surface (nano-hydroxyapatite coating), concerning to bone regeneration: bone to implant contact (%BIC) and bone area fraction occupancy (%BAFO); and nanomechanical properties: elastic modulus (EM) and hardness (H). Mini implants (machined, double acid etched (DAE) and with addition of nano-hydroxyapatite (NANO)) were installed in tibias of healthy rats (n=36) and diabetic rats (n=36). The animals were euthanized at 7 and 30 days. NANO surface presented higher % BIC and % BAFO when compared to machined and DAE (data evaluated as a function of implant surface). Additionally, NANO surface presented higher % BIC and % BAFO than machined and DAE, with statistically significant differences (data as a function of time and implant surface). NANO surface depicted higher EM and H values when compared to machined and DAE surfaces, with statistically significant differences (data as a function of time and implant surface). Nano-hydroxyapatite coated implants presented promising biomechanical results and can be considered an important tool to compensate impaired bone healing reported in diabetics.

Keywords: Diabetes Mellitus, dental implants, histology, hyperglycemia. osseointegration.

Introduction

The success of the dental implants is related to the osseointegration, that is defined as a direct bone-to-implant contact without inter-position of any other tissue (1). In the recent decade, the use of dental implants has been considered a favorable treatment modality to replace missing and lost teeth because of proven biocompatibility, potential for esthetics, and a good long-term prognosis (2, 3). According to Albrektson et al., 1981 some requisites are decisive for achieving osseointegration, including the biocompatibility of the material, surgical technique, implant design, condition of applied loads after implant placement, implant surface quality and the site where the implants are installed (4). However, there are risk factors that may affect and impair the osseointegration of the implant.

Diabetes mellitus (DM) is defined as a “group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action or both” (5). It’s one of the major health problems worldwide (6). Diabetes has been shown to significantly increase the levels of periodontal disease and tooth loss (7-9), and has been considered a risky condition for dental implants, with the fact that it is associated with delayed wound healing (10), prevalence of micro vascular disease (11), and impaired response to infection (12). Therefore, diabetes remains a relative contraindication for implant therapy (13); that is, well-controlled diabetic patients may be considered appropriate for implant therapy, while diabetic patients lacking good glycemic control may be denied the benefits of this treatment (14).

The persistent hyperglycemia in diabetic individuals inhibit osteoblastic activity and alters the response of parathyroid hormone that regulates metabolism of Ca and P (15), decreases collagen formation during callus formation (16), induces apoptosis in lining cells of bone (17) and increases osteoclastic activity (18) due to persistent inflammatory response. It also induces deleterious effect on bone matrix and diminishes growth and accumulation of

extracellular matrix (19). The consequent result is diminished bone formation during healing, which is observed in experimental animal studies (20).

Recent developments in the surface of osseointegrated implants has been proposed to improve osseointegration in individuals with metabolic disorders that can impair bone healing (21). Surface properties involved in the early phase of wound healing are surface topography and chemical composition known to affect cell behavior (22-24) and subsequent tissue attachment to the implanted material. The modification of the implant surface can thus bring benefits to the response of the surrounding bone tissue, accelerating the healing process and/or improving the newly formed bone quality (25, 26). Osseointegration is directly related to microgeometric features, such as the degree of surface roughness, and can also depend on factors as physical and chemical surface properties (27, 28).

Formation of a direct bone-to implant contact (BIC) is an important parameter, which influences the overall success and survival of dental implant therapy (29-31). It has been reported that osteoblastic attachment and collagen synthesis are significantly higher around rough-surfaced implants in contrast to implants with machined surfaces (32, 33). Jimbo et al., 2012 evaluated 20 titanium implants, half prepared with a stable hydroxyapatite (HA) nanoparticle surface and half grit-blasted, acid-etched, and heat-treated, which were inserted into rabbit femurs (34). After 3 weeks of healing, the samples were retrieved for histomorphometry. The nanomechanical properties of the surrounding bone were evaluated by nanoindentation. While both implants revealed similar BIC, the nanoindentation demonstrated that the tissue quality was significantly enhanced around the HA coated implants. It can be said that the nanomechanical characterization provides a possibility to purely evaluate the bone mechanical properties in the reduced scale level without the disturbance of other influential factors (35).

Some experimental studies in animals have demonstrated that DM could negatively interfere with the process of implant osseointegration (36-38). Ajami et al., 2014 revealed that chronic hyperglycemia has an impact on early stages of peri-implant healing, specifically osteoconduction and new bone formation, which consequently affects long-term endosseous implant stability and that compromised implant integration due to hyperglycemia could be abrogated by using nanotopographically complex implants (39). Additionally, newly formed bone around implants was reported immature and less organized in uncontrolled diabetic rats than in non-diabetic controls, suggesting qualitative differences in newly formed bone (3, 36-38). Intriguingly, McCracken et al., 2000 even though supported these findings, reported very low bone-to-implant contact for both diabetic (16.2%) and non-diabetic rats (24.5%) (37). Thus, the aim of this study was to evaluate, in healthy and diabetic rats (as a model of deficient bone repair) the response of a new topography implant surface (nano-hydroxyapatite coating), concerning to bone regeneration: bone to implant contact (%BIC) and bone area fraction occupancy (%BAFO); and nanomechanical properties: elastic modulus (EM) and hardness (H), based on the hypothesis that the histological and mechanical aspect of the bone would be improved due to the effect of the nanostructured HA.

Materials and Methods

Animals

Seventy-two adult male Wistar rats (250–300 g) were included in the study. The animals were treated according to the guidelines for animal care with free access to water and a standard diet and were kept in plastic cages. Prior to the surgical procedures, all animals were allowed to acclimatize to the laboratory environment for 7 days. The animals were randomly allocated to diabetes mellitus group and control group. The protocol was approved by The Ethics Committee on Animal Experimentation at the school of Dentistry of Ribeirao

Preto, University of Sao Paulo – FORP/USP (protocol 2014.1.1083.58.4).

Induction of Diabetes Mellitus

Diabetes was induced by a single intraperitoneal (i.p.) injection of Streptozotocin (STZ, 60 mg/kg, Sigma, St. Louis, Missouri, USA), which was dissolved in 0.2 mL citrate buffered solution (0.01 M, pH 4.5) (n=36). Healthy group received a vehicle i.p. injection at a volume of 1mL/kg (n=36). Blood glucose levels were monitored at the day of implantation and euthanasia through a superficial puncture in the distal tail. Blood glucose was instantly measured with a glucometer (Accu-Check Active monitoring system, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Zug, Switzerland). Only animals with glucose levels higher than 300mg/dL were considered diabetic and included in the study (40).

Surgical Procedures

General anesthesia was induced by administering an injection of 100–130 μ L/100g of animal weight in a 4:3 combination of ketamine (74.1 mg/g of 10 % ketamine hydrochloride; Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, Sao Paulo, Brazil) and xylazine (11.2 mg/kg dopaser; Calier Laboratories S/A, Catalonia, Barcelona, Spain). Next, trichotomy and antisepsis with iodine solution 10% (Rioquímica Ind. Farmaceutica, Sao Paulo, Brazil) at the medial side of the left tibia were performed.

A 15-mm incision was done using a type 15C scalpel blade (Swann-Morton, Sheffield, England) on the medial side of the left tibia. After soft tissues dissection, bone was exposed, washed with copious sterile saline solution (0.9%) and drilled with a 2.0 mm pilot drill (SIN implantes, Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil) using an electric implant motor (Dentscler, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil) at 1000rpm. The perforation was made under constant irrigation with sterile saline solution (0.9 %). A custom-made titanium implant (2.7 mm in

length and 1.4 mm in diameter – SIN implantes, Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil) was randomly installed in the left tibia using a hand driver key (SIN implantes, Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil). Incisions were closed using 5-0 coated Vicryl- suture (Vicryl Ethicon 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, Sao Paulo, Brazil).

Following surgery, the animals were monitored daily for signs of pain, dehiscence, infection, restricted movement, loss of appetite and weight loss. Post-operative analgesia was provided with anti-inflammatory (ketoprofen 0,05mg/kg), and a single dose of antibiotic (penicillin 24.000 IU/kg) was administered. All animals recovered well from the surgery and did not required additional doses of prescriptions.

Experimental Groups

The seventy-two rats were randomly divided into six experimental groups of twelve rats each, and the groups were defined as follows: G1 - machined mini implants installed in healthy rats; G2 - double acid etched (DAE) mini implants installed in healthy rats; G3 - nano-hydroxyapatite (NANO HA) covered mini implants installed in healthy rats; G4 - machined mini implants installed in diabetic rats; G5 - DAE mini implants installed in diabetic rats; and G6 - NANO HA covered mini implants installed in diabetic rats.

The animals were euthanized 7 and 30 days after implants placement (36 animals in each period, 18 healthy and 18 diabetic, 6 from each group) by the intraperitoneal administration of a lethal dose (150 mg/kg) of sodium thiopental (Thiopentax, Cristalia, Sao Paulo, Brazil). The left tibia were removed and fixed in 10 % neutral formalin for 48 hours and the specimens were histologically processed. Histological parameters bone to implant contact (%BIC) and bone area fraction occupancy (%BAFO); and nanomechanical properties: elastic modulus (EM) and hardness (H) were evaluated.

Histologic Sectioning and Histomorphometry

Briefly, the tibia-implant blocks were fixed in 10% formalin buffered with 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.3, for 48 hours and transferred to a solution of 70% ethanol for 72 hours. After dehydration, tibias were embedded in Hard Grade LR White resin (London Resin Company, London, London, United Kingdom) and sectioned using Exakt Cutting System (Exakt, Norderstedt, Hamburg, Germany). The longitudinal sections obtained were polished and mounted on acrylic slides using Exakt Grinding System (Exakt). The resulting 40 μm thick sections were reduced to a thickness of 20 μm and stained with Stevenel's blue and Alizarin red and scanned via an automated slide scanning system and specialized computer software (Aperio Technologies, Vista, California, USA).

For histomorphometric evaluation, an imaging analysis software (ImageJ, NIH, Bethesda, Maryland, USA) was used to quantify and evaluate osseointegration parameters around periimplant surface. The dependent variables of the present study were percentage of bone-to-implant contact (%BIC) and bone area fraction occupancy (%BAFO). %BIC was selected since it quantifies the degree of osseointegration derived from primary stability by measuring the percentage of bone along with implant surface perimeter. %BAFO evaluates the degree of osseointegration derived from secondary stability by measuring the percentage of bone (newly formed and non-vital autografted/native bone due to instrumentation) within the implant threads (41-43). All evaluations were performed in a blinded manner.

Nanoindentation assay

The nanoindentation test was performed as previously described by Coelho et al., 2014 (35). In resume, the resin blocks were processed in the same manner as the histological sections; for scratch removal, further polishing was performed with diamond suspensions of 9 to 1 μm particle size (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA). Nanoindentation ($n = 30$ per

specimen) were performed with a nanoindenter (Hysitron TI 950, Minneapolis, Minnesota, USA) equipped with a Berkovich diamond three-sided pyramid probe (44). A loading profile was developed with a peak load of 300 μN at a rate of 60 $\mu\text{N}/\text{sec}$, followed by a holding time of 10 seconds and an unloading time of 2 seconds. The extended holding period allowed bone to relax to a more linear response, so that no tissue creep effect occurred in the unloading portion of the profile (ISO 14577-4). Therefore, from each indentation, a load- displacement curve was obtained (45).

For each specimen, mechanical testing was performed within the threaded regions (cortical area) between the first and second plateau or the initial set of inter-plateau spaces containing novel bone formation. If no cortical bone was presented within any of the inter-plateau regions, the specimen was discarded. Bone tissue within these regions was initially detected via imaging through a light microscope (Hysitron) (46). Indentations ($n = 30/\text{implant}$) were performed in the identified regions of interest within each plateau region.

From each generated load–displacement curve, the reduced modulus E_r (GPa) and hardness H (GPa) of cortical bone tissue were computed via the Hysitron TriboScan software using the following formulae, respectively:

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi}}{2\sqrt{A(h_c)}} \times S; \quad H = \frac{P_{\max}}{A(h_c)};$$

Where S is the stiffness, h_c is the contact depth, $P_{\max}$ is the maximum applied force (300 μN), and $A(h_c)$ is the contact area computed from the TriboScan software utilizing the area function with respect to the contact depth. Through the reduced modulus E_r , the corresponding elastic modulus E_b (GPa) may be calculated using the following equation:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu_b^2}{E_b} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i}$$

Where ν_b (0.3) is the Poisson's ratio for cortical bone, E_i (1140 GPa) is the elastic modulus of

the indenter, and ν_i (0.07) is the Poisson's ratio for the indenter (47, 48). This methodology (49) has been shown successful in determining the mechanical properties of bone through nanoindentation (34, 44, 50, 51).

Statistical Analysis

The histomorphometric data (percentage of bone-to-implant contact = %BIC and bone area fraction occupancy = %BAFO) and nanomechanical properties (elastic modulus = EM and hardness = H) are presented as a function of mean values with the corresponding 95% confidence interval (mean $\pm$ 95% CI). Preliminary analyses of %BIC, %BAFO, EM and H have shown indistinguishable variances (Levene test, all $p > .25$). %BIC, %BAFO, EM and H data were collected and aligned along a linear mixed model with fixed factors of time (7 and 30 days), systemic condition (healthy and diabetic) and surface chemistry/texture modifications (machined, DAE and NANO) at a random intercept. After administering a significant omnibus test, post-hoc comparison of the experimental groups means was gathered using Tukey test. The analysis was accomplished using SPSS (IBM SPSS 23, IBM Corp., Armonk, NY).

Results

The surgical procedures and follow-up demonstrated no complications regarding to technical conditions or post-operative infections. All animals regained consciousness after 0.5 hours post-surgery and post-operative healing was uneventful. No clinical concerns or adverse events, such as implant exposure, were detected, and a clinically healthy soft tissue aspect was observed throughout the course of the study.

A qualitative evaluation of the histologic micrographs of all groups is depicted in Figure 1 (A-L). All images confirmed successful osseointegration, irrespective of time,

implant type and systemic condition. Overall, a notable difference was observed between 7 and 30 days. With regards to implant type, the NANO group demonstrated more intimate bone to implant interlocking when compared to machined and DAE. Also, at 30 days, NANO coating implants micrographs depicted increased remodeling sites and new bone formation compared to 7 days images.

Correlating to histologic analysis, histomorphometric measurements of percentage of bone to implant contact (%BIC) as a function of time demonstrated statistic significant difference between 7 ($25,32 \pm 2,61$) and 30 ($59,69 \pm 2,61$) days ($p < 0.001$) (Figure 2A). No statistical significant differences were found when healthy ($43,03 \pm 2,61$) and diabetic ($41,96 \pm 2,61$) groups were compared (data as function of systemic condition) ($p = 0.632$) (Figure 2B). When implant surfaces were considered, NANO group ($57,39 \pm 3,20$) exhibited higher %BIC relative to machined ($32,35 \pm 3,20$) and DAE ($37,74 \pm 3,20$) groups (data as a function of implant surface) ($p < 0.001$) (Figure 2C). Data evaluation as a function of time and implant surface highlighted the superiority of NANO group at 30 days ($74,13 \pm 4,53$) compared to others (machined 7 days = $13,62 \pm 4,53$, DAE 7 days = $21,62 \pm 4,53$, NANO 7 days = $40,65$; machined 30 days = $51,07 \pm 4,53$ DAE 30 days = $53,87 \pm 4,53$) ($p < 0.001$) (Figure 2D). When %BIC was evaluated as a function of systemic condition and surface, diabetic ($62,58 \pm 4,53$) NANO group depicted a significant statistical difference ($p < 0.001$) (Figure 2E). Evaluating all factors: time, systemic condition and surface treatments, the results revealed that NANO surface presented the best results in diabetic 7 ($35,94 \pm 6,40$) and 30 days ($79,80 \pm 6,40$) ($p < 0.001$) (Figure 2F).

Percentage of bone area fraction occupancy (%BAFO) as a function of time demonstrated statistic significant difference between 7 ($31,46 \pm 2,99$) and 30 ($52,87 \pm 2,99$) days ($p < 0.001$) (Figure 3A). Healthy group ($44,31 \pm 2,99$) presented higher %BAFO when compared to diabetic ($40,02 \pm 2,99$) (data as function of systemic condition) ($p = 0.048$)

(Figure 3B). When implant surfaces were considered, NANO group ($47,64 \pm 3,66$) exhibited higher %BAFO relative to machined ($38,80 \pm 3,66$) and DAE ($40,05 \pm 3,66$) groups (data as a function of implant surface) ($p=0.002$) (Figure 3C). Data evaluation as a function of time and implant surfaces highlighted the superiority of NANO group at 30 days ($56,95 \pm 5,18$) compared to others (machined 7 days = $26,83 \pm 5,18$, DAE 7 days = $29,22 \pm 5,18$, NANO 7 days $38,34 \pm 5,18$, machined 30 days = $50,77 \pm 5,18$, DAE 30 days = $50,88 \pm 5,18$) ($p<0.001$) (Figure 3D). No statistical significant differences were found when %BAFO was evaluated as a function of systemic condition and surface ($p=0.616$) (Figure 3E). Evaluating all factors (time, systemic condition and surface treatment) the results revealed that NANO surface presented the best results at 7 days (healthy = $38,28 \pm 7,33$ and diabetic = $38,39 \pm 7,33$) ($p<0.009$) (Figure 3F).

The elastic modulus (EM) as a function of time demonstrated statistic significant difference between 7 ($8,94 \pm 1,36$) and 30 ($14,14 \pm 1,22$) days ($p<0.001$) (Figure 4A). No statistical significant differences were found when compared healthy ($11,07 \pm 1,35$) and diabetic ($12,01 \pm 1,24$) groups (data as function of systemic condition) ($p=0.308$) (Figure 4B). When implant surfaces were considered, NANO group ($14,89 \pm 1,59$) exhibited higher EM relative to machined ($7,28 \pm 1,51$) and DAE ($12,45 \pm 1,65$) groups (data as a function of implant surface) ($p<0.037$) (Figure 4C). Data evaluation as a function of time and implant surface highlighted the superiority of NANO group at 30 days ($16,70 \pm 1,97$) compared to others (machined 30 days = $12,52 \pm 2,23$, DAE 30 days = $13,20 \pm 2,16$) ($p<0.027$) (Figure 4D). When EM was evaluated as a function of systemic condition and surface, the diabetic NANO group ($15,71 \pm 2,16$) depicted higher values ($p<0.001$) (Figure 4E). Evaluating all factors (time, systemic condition and surface treatment) the results revealed that surface treated implants presented superior EM than machined ($p<0.031$) (Figure 4F).

Hardness (H) as a function of time demonstrated statistic significant difference between 7 ($0,31 \pm 0,06$) and 30 ($0,64 \pm 0,05$) days ($p < 0.001$) (Figure 5A). Healthy group ($0,53 \pm 0,06$) presented higher H when compared to diabetic ($0,42 \pm 0,05$) (data as function of systemic condition) ($p = 0.015$) (Figure 5B). When implant surface were considered, NANO group ($0,66 \pm 0,07$) exhibited higher H relative to machined ($0,34 \pm 0,07$) and DAE ($0,43 \pm 0,07$) groups (data as a function of implant surface) ($p < 0.037$) (Figure 5C). Data evaluation as a function of time and implant surface highlighted the superiority of NANO group at 30 days ($0,9 \pm 0,09$) compared to others (machined 30 days = $0,55 \pm 0,10$, DAE 30 days = $0,47 \pm 0,10$) ($p < 0.027$) (Figure 5D). When H was evaluated as a function of systemic condition and surface, the healthy NANO group ($0,79 \pm 0,11$) depicted higher values ($p < 0.002$) (Figure 5E). Evaluating all factors (time, systemic condition and surface treatment) the results revealed that surface treated implants presented superior H than machined ($p < 0.025$) and that NANO healthy 30 days ($1,25 \pm 0,14$) presented the higher values of H (Figure 5F).

Discussion

Osseointegration has been defined as the close contact between bone and biomaterials at the optical microscopic level (52, 53) and its success for oral rehabilitation is higher than 90% (54-56). Over the previous 2 decades, significant attention has been devoted to improving host-to-implant biocompatibility and biomechanical responses through implant design. Among design alterations, surface modification has been the most evaluated parameter, because it is the first part of the implant to interact with the host biofluids, thus having the potential of significantly altering the short-term interaction between bone and implant (57-59).

The present study evaluated, in healthy and diabetic rats, the response of a new topography implant surface (nano-hydroxyapatite coating), concerning to histomorphometric

bone regeneration (%BIC and %BAFO) and nanomechanical properties (elastic modulus and hardness). The postulated null hypothesis that histological and mechanical aspect of the bone would be improved due to the effect of the nanostructured HA was accepted since histomorphometric measurements and nanomechanical properties depicted statistical significant differences for NANO group in all evaluated parameters (data as a function of implant surface).

The basic osseointegration processes of hemostasis, inflammation, proliferation and remodeling are known to be impaired by metabolically compromised health conditions, such as diabetes mellitus (DM) (3, 36, 60, 61). In order to improve the rate and extend of osseointegration of dental implants in such challenging scenarios, implant surface chemistry/texture modifications have been suggested (62, 63). Nonetheless, studies comparing their potential benefits are still not clear when used in a DM model (64). In the present study, bone remodeling appeared to be at a more advanced stage around implants with treated surfaces and to a lesser degree also around machined implants. These results suggest that bone remodeling can start earlier around advanced, optimized, modified implant surfaces.

The development of microscale surface topography, as dual acid-etched (DAE) implants, enhanced bone formation along with implant surface when compared to machined (65-67). Additionally, the emergence of chemically/topographically complex surfaces, such as bioactive nano-hydroxyapatite coated implants (NANO), provided a more suitable arrangement that better mimics natural tissue organization and facilitates interaction with tissues biomolecules and cell-cell communication during healing process (68-70). From the histomorphometrical analysis, NANO surface presented higher %BIC and %BAFO when compared with machined and DAE (regarding implant surface). Furthermore, through an implant-specific healing mechanism, at 30 days, NANO surface presented higher %BIC and %BAFO than machined and DAE, with statistically significant differences (data evaluation as

a function of time and implant surface). Literature findings support the evidence through previous animal studies that demonstrated NANO complex surfaces outperforming microtopography surfaces in metabolically compromised subjects (21, 39, 71).

The noteworthy results evidenced for complex implant surface designs in challenging scenarios, such as low-density bone sites, motivated their use for compromised systemic conditions that affect bone metabolism and osseointegration (72). Nanoindentation of bone around implants has the potential to elucidate the qualitative aspects of osseointegration (34). In our study, data evaluated as function of time depicted the superiority of EM and H at 30 days compared to 7 days. When the data was evaluated as function of implant surface, NANO group presented higher EM and H than DAE and machined. Literature findings comparing the use of NANO and DAE surfaces have confirmed the superiority of the former regarding to histological parameters (72, 73).

Histological analysis is still considered as the “gold standard” to evaluate bone formation. However, this technique has some limitations. For instance, cutting and grinding the implant in bone blocks may damage the interface and influence results. Two dimensional histology may not have captured the actual process due to its limited scope of evaluation, since it may depend on where the section was taken from (74). Therefore, the lack of a microtomographic investigation can be considered a limitation of this study. Additionally, gene expression analysis could provide insights about normal cellular processes, such as osteoblast differentiation of some important bone markers, alkaline phosphatase protein expression, and extracellular matrix mineralization (75, 76). Finally, other periods of evaluation might contribute for more reliable results.

This study demonstrates significant up-regulation of the mineralization process that was detected with bone mechanical property assessment through nanoindentation and histologic parameters. The conventional techniques such as the removal torque testing can be

affected not only by the micro-features, but also by the macro-features of the implant. It can be said that the nanomechanical characterization provides a possibility to purely evaluate the bone mechanical properties in the reduced scale level without the disturbance of other influential factors. The nanoindentation technique is an appropriate method to take into account the anisotropic organization of bone (48) and map the range of mechanical properties of bone around dental implants. With this technique, the process of bone mineralization relative to implant design variations (e.g., instrumentation, bulk, and surface) can be evaluated. In the present study, it is evident that the degree of mineralization (elastic modulus and hardness) of the bone in the proximity of the implant was significantly enhanced for surface treated implants, regardless systemic condition and time. Subsequently, the current results and literature findings support the principle regarding to the use of bioactive nanoscale surface modifications as a compensation for the negative influence of DM on osseointegration.

Conclusions

Nano-hydroxyapatite coated implants presented promising biomechanical results and can be considered an important tool to compensate impaired bone healing reported in diabetics. These results suggest that this surface should be tested in human controlled trials, evaluating challenging clinical situations.

Acknowledgements:

Sebastião Carlos Bianco and Adriana Luisa Gonçalves de Almeida are acknowledged for their technical assistance during the experiments.

Funding:

This research was supported by the State of Sao Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil) (grant numbers: 2015/09879-0 and 2016/14584-2) and the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) (grant number: 446840/2014-9).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest associated with this study

References

1. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969;3(2):81-100.
2. Geckili O, Bilhan H, Geckili E, Cilingir A, Mumcu E, Bural C. Evaluation of possible prognostic factors for the success, survival, and failure of dental implants. *Implant Dent.* 2014;23(1):44-50.
3. Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998;13(5):620-9.
4. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981;52(2):155-70.
5. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2005;28 Suppl 1:S37-42.
6. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* 1998;21(9):1414-31.
7. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1991;62(2):123-31.
8. Oliver RC, Tervonen T. Periodontitis and tooth loss: comparing diabetics with the general population. *J Am Dent Assoc.* 1993;124(12):71-6.
9. Safkan-Seppala B, Ainamo J. Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1992;19(1):24-9.
10. Rothwell BR, Richard EL. Diabetes mellitus: medical and dental considerations. *Spec Care Dentist.* 1984;4(2):58-65.
11. Frantzis TG, Reeve CM, Brown AL, Jr. The ultrastructure of capillary basement membranes in the attached gingiva of diabetic and nondiabetic patients with periodontal disease. *J Periodontol.* 1971;42(7):406-11.
12. McMahon MM, Bistrian BR. Host defenses and susceptibility to infection in patients with diabetes mellitus. *Infect Dis Clin North Am.* 1995;9(1):1-9.
13. Michaeli E, Weinberg I, Nahlieli O. Dental implants in the diabetic patient: systemic and rehabilitative considerations. *Quintessence Int.* 2009;40(8):639-45.
14. Oates TW, Huynh-Ba G, Vargas A, Alexander P, Feine J. A critical review of diabetes, glycemic control, and dental implant therapy. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(2):117-27.
15. Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003;52(6):1502-10.
16. Gooch HL, Hale JE, Fujioka H, Balian G, Hurwitz SR. Alterations of cartilage and collagen expression during fracture healing in experimental diabetes. *Connect Tissue Res.* 2000;41(2):81-91.
17. He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology.* 2004;145(1):447-52.
18. Kayal RA, Tsatsas D, Bauer MA, Allen B, Al-Sebaei MO, Kakar S, et al. Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. *J Bone Miner Res.* 2007;22(4):560-8.

19. Weiss RE, Gorn AH, Nimni ME. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes*. 1981;30(8):670-7.
20. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2003;144(1):346-52.
21. Schlegel KA, Prechtel C, Most T, Seidl C, Lutz R, von Wilmowsky C. Osseointegration of SLActive implants in diabetic pigs. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(2):128-34.
22. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. 1996;17(2):137-46.
23. Chehroudi B, Gould TR, Brunette DM. Effects of a grooved titanium-coated implant surface on epithelial cell behavior in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res*. 1989;23(9):1067-85.
24. Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials*. 1997;18(24):1573-83.
25. Wennerberg A, Albrektsson T. Current challenges in successful rehabilitation with oral implants. *J Oral Rehabil*. 2011;38(4):286-94.
26. Novaes AB, Jr., de Souza SL, de Barros RR, Pereira KK, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J*. 2010;21(6):471-81.
27. Sul YT, Johansson C, Wennerberg A, Cho LR, Chang BS, Albrektsson T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(3):349-59.
28. Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007;23(7):844-54.
29. Javed F, Almas K, Crespi R, Romanos GE. Implant surface morphology and primary stability: is there a connection? *Implant Dent*. 2011;20(1):40-6.
30. Pinholt EM. Branemark and ITI dental implants in the human bone-grafted maxilla: a comparative evaluation. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(5):584-92.
31. Schulz MC, Korn P, Stadlinger B, Range U, Moller S, Becher J, et al. Coating with artificial matrices from collagen and sulfated hyaluronan influences the osseointegration of dental implants. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(1):247-58.
32. Jiang P, Liang J, Song R, Zhang Y, Ren L, Zhang L, et al. Effect of Octacalcium-Phosphate-Modified Micro/Nanostructured Titania Surfaces on Osteoblast Response. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(26):14384-96.
33. Marin-Pareja N, Salvagni E, Guillem-Marti J, Aparicio C, Ginebra MP. Collagen-functionalised titanium surfaces for biological sealing of dental implants: effect of immobilisation process on fibroblasts response. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;122:601-10.
34. Jimbo R, Coelho PG, Bryington M, Baldassarri M, Tovar N, Currie F, et al. Nano hydroxyapatite-coated implants improve bone nanomechanical properties. *J Dent Res*. 2012;91(12):1172-7.
35. Coelho PG, Takayama T, Yoo D, Jimbo R, Karunakaran S, Tovar N, et al. Nanometer-scale features on micrometer-scale surface texturing: a bone histological, gene expression, and nanomechanical study. *Bone*. 2014;65:25-32.
36. Giglio MJ, Giannunzio G, Olmedo D, Guglielmotti MB. Histomorphometric study of bone healing around laminar implants in experimental diabetes. *Implant Dent*. 2000;9(2):143-9.

37. McCracken M, Lemons JE, Rahemtulla F, Prince CW, Feldman D. Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15(3):345-54.
38. Takeshita F, Iyama S, Ayukawa Y, Kido MA, Murai K, Suetsugu T. The effects of diabetes on the interface between hydroxyapatite implants and bone in rat tibia. *J Periodontol*. 1997;68(2):180-5.
39. Ajami E, Mahno E, Mendes VC, Bell S, Moineddin R, Davies JE. Bone healing and the effect of implant surface topography on osteoconduction in hyperglycemia. *Acta Biomater*. 2014;10(1):394-405.
40. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba j R, Marcantonio j E. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent*. 2003;12(4):333-9.
41. Coelho PG, Marin C, Granato R, Giro G, Suzuki M, Bonfante EA. Biomechanical and histologic evaluation of non-washed resorbable blasting media and alumina-blasted/acid-etched surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(1):132-5.
42. Jinno Y, Jimbo R, Tovar N, Teixeira HS, Witek L, Coelho PG. In Vivo Evaluation of Dual Acid-Etched and Grit-Blasted/Acid-Etched Implants With Identical Macrogeometry in High-Density Bone. *Implant Dent*. 2017;26(6):815-9.
43. Gil LF, Sarendranath A, Neiva R, Marao HF, Tovar N, Bonfante EA, et al. Bone Healing Around Dental Implants: Simplified vs Conventional Drilling Protocols at Speed of 400 rpm. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017;32(2):329-36.
44. Baldassarri M, Bonfante E, Suzuki M, Marin C, Granato R, Tovar N, et al. Mechanical properties of human bone surrounding plateau root form implants retrieved after 0.3-24 years of function. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(7):2015-21.
45. Doerner MF, Nix WD. A method for interpreting the data from depth- sensing indentation instruments. *J Mater Res* 1986;1:601 - 9.
46. Butz F, Aita H, Wang CJ, Ogawa T. Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. *J Dent Res*. 2006;85(6):560-5.
47. Hoffler CE, Guo XE, Zysset PK, Goldstein SA. An application of nanoindentation technique to measure bone tissue Lamellae properties. *J Biomech Eng*. 2005;127(7):1046-53.
48. Hoffler CE, Moore KE, Kozloff K, Zysset PK, Brown MB, Goldstein SA. Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli. *Bone*. 2000;26(6):603-9.
49. Lee KL, Sobieraj M, Baldassarri M, Gupta N, Pinisetty D, Janal MN, et al. The effects of loading conditions and specimen environment on the nanomechanical response of canine cortical bone. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(8):4582-6.
50. Anchieta RB, Baldassarri M, Guastaldi F, Tovar N, Janal MN, Gottlow J, et al. Mechanical property assessment of bone healing around a titanium-zirconium alloy dental implant. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014;16(6):913-9.
51. Jimbo R, Anchieta R, Baldassarri M, Granato R, Marin C, Teixeira HS, et al. Histomorphometry and bone mechanical property evolution around different implant systems at early healing stages: an experimental study in dogs. *Implant Dent*. 2013;22(6):596-603.
52. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont*. 2004;17(5):536-43.
53. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont*. 2004;17(5):544-64.

54. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*. 1981;10(6):387-416.
55. Henry PJ, Laney WR, Jemt T, Harris D, Krogh PH, Polizzi G, et al. Osseointegrated implants for single-tooth replacement: a prospective 5-year multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11(4):450-5.
56. Jemt T, Chai J, Harnett J, Heath MR, Hutton JE, Johns RB, et al. A 5-year prospective multicenter follow-up report on overdentures supported by osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11(3):291-8.
57. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials*. 2007;28(32):4748-55.
58. Berglundh T, Abrahamsson I, Albouy JP, Lindhe J. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(2):147-52.
59. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*. 2004;83(7):529-33.
60. King S, Klineberg I, Levinger I, Brennan-Speranza TC. The effect of hyperglycaemia on osseointegration: a review of animal models of diabetes mellitus and titanium implant placement. *Arch Osteoporos*. 2016;11(1):29.
61. Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, et al. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8(2):260-70.
62. Burgos PM, Rasmusson L, Meirelles L, Sennerby L. Early bone tissue responses to turned and oxidized implants in the rabbit tibia. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008;10(3):181-90.
63. Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res*. 1998;40(1):1-11.
64. Jiang H, Ma X, Zhou W, Dong K, Rausch-Fan X, Liu S, et al. The Effects of Hierarchical Micro/Nano-Structured Titanium Surface on Osteoblast Proliferation and Differentiation Under Diabetic Conditions. *Implant Dent*. 2017;26(2):263-9.
65. Coelho PG, Bonfante EA, Pessoa RS, Marin C, Granato R, Giro G, et al. Characterization of five different implant surfaces and their effect on osseointegration: a study in dogs. *J Periodontol*. 2011;82(5):742-50.
66. Coelho PG, Jimbo R, Tovar N, Bonfante EA. Osseointegration: hierarchical designing encompassing the micrometer, micrometer, and nanometer length scales. *Dent Mater*. 2015;31(1):37-52.
67. Khang W, Feldman S, Hawley CE, Gunsolley J. A multi-center study comparing dual acid-etched and machined-surfaced implants in various bone qualities. *J Periodontol*. 2001;72(10):1384-90.
68. Hayashi M, Jimbo R, Lindh L, Sotres J, Sawase T, Mustafa K, et al. In vitro characterization and osteoblast responses to nanostructured photocatalytic TiO₂ coated surfaces. *Acta Biomater*. 2012;8(6):2411-6.
69. Tomsia AP, Lee JS, Wegst UG, Saiz E. Nanotechnology for dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28(6):e535-46.
70. Webster TJ, Ahn ES. Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2007;103:275-308.

71. Ajami E, Bell S, Liddell RS, Davies JE. Early bone anchorage to micro- and nano-topographically complex implant surfaces in hyperglycemia. *Acta Biomater.* 2016;39:169-79.
72. Coelho PG, Teixeira HS, Marin C, Witek L, Tovar N, Janal MN, et al. The in vivo effect of P-15 coating on early osseointegration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014;102(3):430-40.
73. Coelho PG, Freire JN, Granato R, Marin C, Bonfante EA, Gil JN, et al. Bone mineral apposition rates at early implantation times around differently prepared titanium surfaces: a study in beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(1):63-9.
74. Vandeweghe S, Coelho PG, Vanhove C, Wennerberg A, Jimbo R. Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: a comparison with histomorphometry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(7):1259-66.
75. Beck GR, Jr., Sullivan EC, Moran E, Zerler B. Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem.* 1998;68(2):269-80.
76. Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev.* 1996;76(2):593-629.

Figures and legends

Figure 01. Histologic micrographs of all experimental groups (A-L). Stevenel's blue Alizarin red stained histologic micrographs of healthy (A, B, C, G, H and I) and diabetic (D, E, F, J, K and L) groups for machined (A, D, G and E), DAE (B, E, H and K) and NANO coated (C, F, I and L) implant surface treatments. All images confirmed successful osseointegration, irrespective of time, implant type and systemic condition. Overall, a notable difference was observed between 7 and 30 days. With regards to implant type, the NANO group demonstrated more intimate bone to implant interlocking when compared to machined and DAE. Also, at 30 days, NANO coating implants micrographs depicted increased remodeling sites and new bone formation compared to 7 days images.

Figure 2. A-F. Graphs representing the percentage of bone to implant contact (%BIC) differently arranged as a function of study factors (mean and 95%CI). Significant difference was seen between 7 and 30 days in vivo (A). No statistical significant differences were found when compared healthy and diabetic group (data as function of systemic condition) (B). When implant surface were considered, NANO group exhibited higher %BIC relative to machined and DAE groups (data as a function of implant surface) (C). Data evaluation as a function of time and implant surface highlighted the superiority of NANO group at 30 days compared to others (D). When %BIC was evaluated as a function of systemic condition and surface, diabetic NANO group depicted a significant statistical difference (E). Evaluating all factors: time, systemic condition and surface treatment the results revealed that NANO surface presented the best results in diabetic group (7 and 30 days) (F). Identical letters indicate no significant difference among groups.

Figure 3. A-F. Graphs representing the percentage of bone area fraction occupancy (%BAFO) differently arranged as a function of study factors (mean and 95%CI). Significant difference was seen between 7 and 30 days in vivo (A). Statistical significant difference was found when compared healthy and diabetic group (data as function of systemic condition) (B). When implant surface were considered, NANO group exhibited higher %BAFO relative to machined and DAE groups (data as a function of implant surface) (C). Data evaluation as a function of time and implant surface highlighted the superiority of NANO group at 30 days compared to others (D). No statistical significant differences were found when %BAFO was evaluated as a function of systemic condition and surface (E). Evaluating all factors (time, systemic condition and surface treatment) the results revealed that NANO surface presented the best results at 7 days (healthy and diabetic group) (F). Identical letters indicate no significant difference among groups.

Figure 4. A-F. Graphs representing elastic modulus (EM) differently arranged as a function of study factors (mean and 95%CI). Significant difference was seen between 7 and 30 days *in vivo* (A). No statistical significant difference were found when compared healthy and diabetic group (data as function of systemic condition) (B). When implant surface were considered, NANO group exhibited higher EM relative to machined and DAE groups (data as a function of implant surface) (C). Data evaluation as a function of time and implant surface highlighted the superiority of NANO group at 30 days compared to others (D). When EM was evaluated as a function of systemic condition and surface, diabetic NANO group depicted higher values (E). Evaluating all factors: time, systemic condition and surface treatment the results revealed that surface treated implants presented superior EM than machined (F). Identical letters indicate no significant difference among groups.

Figure 5. A-F. Graphs representing hardness (H) differently arranged as a function of study factors (mean and 95%CI). Significant difference was seen between 7 and 30 days *in vivo* (A). Healthy group presented higher H when compared to diabetic (data as function of systemic condition) (B). When implant surface were considered, NANO group exhibited higher H relative to machined and DAE groups (data as a function of implant surface) (C). Data evaluation as a function of time and implant surface highlighted the superiority of NANO group at 30 days compared to others (D). When H was evaluated as a function of systemic condition and surface, healthy NANO group depicted depicted higher values (E). Evaluating all factors: time, systemic condition and surface treatment the results revealed that surface treated implants presented superior H than machined and that NANO healthy 30 days presented the higher values of H (F). Identical letters indicate no significant difference among groups.

Artigo 2

Influence of nano-hydroxyapatite coating implants on gene expression of osteogenic markers and micro-CT parameters. An *in vivo* study in diabetic rats.

Paula Gabriela Faciola Pessôa de Oliveira¹, Mariana Sales de Melo Soares¹, Mário Taba Jr.¹, Daniela Bazan Palioto¹, Michel Reis Messoria¹, Bruna Ghiraldini², Felipe Anderson de Sousa Nunes¹, Sérgio Luís Scombatti de Souza¹.

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

²Paulista University, School of Dentistry, Sao Paulo, SP, Brazil.

Correspondence address:

Sérgio Luís Scombatti de Souza

Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology

School of Dentistry of Ribeirao Preto University of Sao Paulo

Av do Café, s/n. Zip: 14040-904 Ribeirao Preto - SP - Brazil

Tel: +55 16 3315-4141

Email: scombatti@forp.usp.br

Abstract

The aim of this study was to evaluate, in healthy and diabetic rats, the response of a new topography implant surface (nano-hydroxyapatite coating) through gene expression analysis (runx-related transcription factor 2 (Runx2), alkaline phosphatase (Alp), osteopontin (Opn), osteocalcin (Oc), receptor activator of nuclear factor-kappa B (Rank), receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (Rank-L), and osteoprotegerin (Opg)) and a three-dimensional (3D) evaluation using micro-CT (percent bone volume (BV/TV, %); percent intersection surface (BIC, %); bone surface/volume ratio (BS/BV, mm); and total porosity (To.Po, %)). Mini implants (machined, double acid etched (DAE) and with addition of nano-hydroxyapatite (NANO)) were installed in tibias of healthy rats and diabetic rats. The animals were euthanized at 7 and 30 days. Evaluating all factors the relative expression of Rank showed that NANO surface presented the best results at 7 days (diabetic rats). Furthermore the levels of Runx2, Alp, Oc and Opn suggest an increase in osteoblasts proliferation, especially in early stages of osseointegration. %BIC in healthy and diabetic (7 days) depicted statistically significant differences for NANO HA when compared to machined and DAE. BV/TV (%), BS/BV (mm) and To.Po (%) demonstrated higher values for NANO group in all evaluated time point and irrespective of systemic condition, but BS/BV 30 days (healthy rat) and 7 and 30 days (diabetic rat). Microtomographic and gene expression analyses have shown the benefits of nano-hydroxyapatite coating implants in promote new bone formation in diabetic rats.

Keywords: Diabetes Mellitus, dental implants, gene expression, microtomography.

Introduction

Osseointegration has been described as the intimate contact between bone and biomaterials occurring at the optical microscopy level, and this phenomenon allows implants to replace load-bearing organs, restoring their form and function (1). Implant dentistry has become one of the most successful dental specialties, with success rates often reported at greater than 90 % (2).

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia yielded by abnormalities in the secretion or response of cells to insulin, which is a hormone, produced by beta cells in the pancreatic islets of Langerhans (3). Type 1 diabetes is an autoimmune disease associated to pancreatic β -cell destruction and therefore requires insulin therapy, while type 2 diabetes is characterized by a relative rather than absolute insulin deficiency and is usually a multi-factorial disease (4). Chronic hyperglycemia, pathognomonic of DM, is known to have a significant impact on bone healing. Nevertheless, the increasing success of dental implants, along with the realized benefits of implant therapy, have accommodated patients with controlled diabetes as candidates for treatment (5-7). However, for those who fail to control their glucose levels, the attendant uncontrolled hyperglycemia is considered a contra-indication for dental implant placement.

It has been demonstrated that alterations in implant topography, energy, wettability, chemistry or an association of them affect cell adhesion, migration, proliferation, differentiation, messenger ribonucleic acid (mRNA) expression, protein synthesis, and secretion, which may have a beneficial effect on interfacial tissue formation (8-10). A large number of studies have shown that increasing the implant surface texture by a variety of processes, such as acid etching and various forms of grit-blasting, positively affected early healing, leading to greater degrees of integration and biomechanical fixation (11). In addition to texture alterations, chemistry modifications, such as the incorporation of hydroxyapatite

(HA) as a surface coating through a variety of processes, resulted in highly osseoconductive surfaces (11).

Nano-scale roughness may be a decisive factor for osteogenesis, because the size of proteins and cell membrane receptors corresponds to surface topography on this length scale. Gittens et al., 2011 reported that nano-scale modifications considerably enhanced the differentiation of pre-osteoblasts, which showed significantly higher levels of osteocalcin and osteoprotegerin expression *in vitro* (12). Furthermore, Meirelles et al., 2007 conducted an animal study with implants containing nanostructures and polished implants deliberately lacking them, and found that the former had higher bone-to-implant contact than the latter implant surfaces (13). These reports suggest that cells, particularly osteoblasts, respond to topographical alterations at the nanometer scale. Additionally, reduced osteoid formation, delayed osteoid mineralization, and reduced overall bone volume and maturation in hyperglycemia were reported by Goodman and Hori, 1984 (14).

Micro-computed tomography (micro-CT) has become a powerful tool in dental research and is promising for qualitative and quantitative analyses of implant osseointegration (15-17). It's widely used for observing and analyzing the internal structure of hard tissue due to its advantages of rapidity, reproducibility, and nondestructiveness (18). Additionally, micro-CT also allows for accurate three-dimensional (3D) measurements of bone-to-implant contact (BIC), and is used to measure several variables, including bone volume (BV), total volume (TV), bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), and trabecular separation (Tb.Sp) (19).

Ajami et al., 2014 performed a microtomography and histologic study using euglycemic and hyperglycemic rats and conclude that compromised implant integration in hyperglycemia is abrogated by the addition of nanotopographical features to an underlying microtopographically complex implant surface (20). Thus, the aim of this study was to

evaluate, in healthy and diabetic rats, the response of a new topography implant surface (nano-hydroxyapatite coating) through gene expression analysis (evaluating runt-related transcription factor 2 (Runx2), alkaline phosphatase (Alp), osteopontin (Opn), osteocalcin (Oc), receptor activator of nuclear factor-kappa B (Rank), receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (Rank-L), and osteoprotegerin (Opg)) and a three-dimensional (3D) evaluation using micro-CT (evaluating the percent bone volume (BV/TV, %); percent intersection surface (BIC, %); bone surface/volume ratio (BS/BV, mm); and total porosity (To.Po, %)), in order to investigate the surface modifications at the nano-scale in a compromise model of bone healing at two different time points (7 and 30 days).

Materials and Methods

Animals

This study was approved by The Ethics Committee on Animal Experimentation at the school of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – FORP/USP (protocol 2014.1.1083.58.4).

Seventy-two adult male Wistar rats (250–300 g) were included in the study. The animals were treated according to the guidelines for animal care with free access to water and a standard diet and were kept in plastic cages. Prior to the surgical procedures, all animals were allowed to acclimatize to the laboratory environment for 7 days. The animals were randomly allocated to diabetes mellitus group or control group.

Induction of Diabetes Mellitus

Diabetes was induced by a single intraperitoneal (i.p.) injection of Streptozotocin (STZ, 60 mg/kg, Sigma, St. Louis, Missouri, USA), which was dissolved in 0.2 mL citrate

buffered solution (0.01 M, pH 4.5) (n = 36). Healthy group received a vehicle i.p. injection at a volume of 1 mL/kg (n = 36). Blood glucose levels were monitored at the day of implantation and before euthanasia through a superficial puncture in the distal tail, and instantly measured with a glucometer (Accu-Check Active monitoring system, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Zug, Switzerland). Only animals with glucose levels higher than 300 mg/dL were considered diabetic and included in the study (21).

Surgical Procedures

General anesthesia was induced by administering an injection of 100–130 μ L/(100 g animal weight) in a 4:3 combination of ketamine (74.1 mg/g of 10 % ketamine hydrochloride; Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, Sao Paulo, Brazil) and xylazine (11.2 mg/kg dopaser; Calier Laboratories S/A, Catalonia, Barcelona, Spain). Next, trichotomy and antisepsis with iodine solution 10 % (Rioquímica Ind. Farmaceutica, Sao Jose do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil) at the medial side of the right and left tibia were performed.

Using a type 15C scalpel blade (Swann-Morton, Sheffield, England), a 15-mm incision was done on the medial side of the right and left tibias. After dissection with a periosteum separator, bone was exposed, washed with copious sterile saline solution (0.9 %) and drilled with a 2.0 mm length pilot drill (SIN implantes, Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil) using an electric implant motor (Dentscler, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil) at 1000 rotation per minute (rpm). The perforation was made under constant irrigation with sterile saline solution (0.9 %). A custom-made titanium implant (2.7 mm in length and 1.4 mm in diameter – SIN implantes, Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil) was randomly installed in the left or right tibia using a hand driver key (SIN implantes, Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil). Incisions were closed using 5-0 coated Vicryl suture (Vicryl Ethicon 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, Sao Paulo, Brasil).

Following surgery, the animals were monitored daily for signs of pain, dehiscence, infection, restricted movement, loss of appetite and weight loss. Post-operative analgesia was provided with anti-inflammatory (ketoprofen 0,05mg/kg), and a single dose of antibiotic (penicillin 24.000 IU/kg) was also administered. All animals recovered well from the surgery and did not require additional doses of prescriptions.

Experimental Groups

The seventy-two rats were randomly divided into six experimental groups of twelve rats each, and the groups were defined as follows: G1 - machined mini implants installed in healthy rats; G2 - double acid etched (DAE) mini implants installed in healthy rats; G3 - nano-hydroxyapatite (NANO) covered mini implants installed in healthy rats; G4 - machined mini implants installed in diabetic rats; G5 - DAE mini implants installed in diabetic rats; and G6 - NANO covered mini implants installed in diabetic rats.

The animals were euthanized 7 and 30 days after implants placement (36 animals in each period, 18 healthy and 18 diabetic, 6 from each group) by the intraperitoneal administration of a lethal dose (150 mg/kg) of sodium thiopental (Thiopentax, Cristalia, Sao Paulo, Brazil). The implant and surrounding bone from right tibia were carefully collected with the use of a $\Phi 3.0$ mm trephine bur (Alpha instruments, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil); thereafter, the samples were frozen at -80°C until analysis. The left tibia was removed and fixed in 10 % neutral formalin for 48 hours for micro-CT analysis. Gene expression of Runx2, Alp, Opn, Oc, Rank, Rankl and Opg, and micro-CT parameters of percent bone volume (BV/TV, %), percent intersection surface (BIC, %), bone surface/volume ratio (BS/BV, mm), and total porosity (To.Po, %), were evaluated.

Quantitative real-time polymerase chain reaction assay

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was carried out at 7 and 30 days to evaluate the gene expression of Runx2, Alp, Oc, Op, Rank, RankL and Opg. The implants were removed and bone fragments of two specimens of the same group were pooled and immediately crushed, and the total RNA was extracted with Trizol reagent (Life Technologies – Invitrogen, Carlsbad, CA) followed by SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity were determined using NanoVue spectrophotometer (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) by optical density at a wavelength of 260 and 260:280 nm, respectively, and only samples presenting 260:280 ratios higher than 1.8 were analyzed. The integrity of ribosomal RNA was evaluated using the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Stockport, Manchester, United Kingdom). Samples with RNA Integrity Number (RIN) values equal or higher than 7 were used to synthesize complementary DNA (cDNA) from 1 µg of total RNA, using cDNA High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), according to manufacturer's instructions. Real-time PCR was carried out in triplicate and performed in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA); the thermal cycling conditions were 50°C (2 min), 95°C (20 s), and 40 cycles of 95°C (3 s) and 60°C (30 s) in a 10 µl reaction volume, using 5 µl of TaqMan universal PCR master mix AmpErase UNG 2X (Life Technologies-Invitrogen), 0.5 µl of TaqMan probes (20X TaqMan gene expression assay mix) and 1.125 µg/µl of cDNA. The relative gene expression was calculated in reference to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression and the real changes were expressed relative to the gene expression of the healthy machined 7 days group, using the comparative delta-Ct method (22).

Computed microtomographic analysis

The samples were fixed in 10 % buffered formalin solution (pH = 7) for 2 days. Sequentially, the micro-CT analysis was performed using a Skyscan 1172 micro-CT scanner (Bruker, Kontich, Antwerp, Belgium). All scans were obtained at 100 kV and 100 μ A, using an aluminum–copper filter to optimize the contrast, and set at 5.87 mm pixel size, 360 rotation, 4 frames averaging, a rotation step of 0.40. The reconstruction software (NRecon v.1.6.10.4, Bruker, Kontich, Antwerp, Belgium) was used to create the images, which were positioned according to the implant long axis.

The 3D analysis was performed using the CTAn software (CTAn., v. 1.15.4.0, Bruker, Kontich, Antwerp, Belgium) and the following parameters were analyzed: percent bone volume (BV/TV, %), percent intersection surface (BIC, %), bone surface/volume ratio (BS/BV, mm), and total porosity (To.Po, %).

A task list was created (custom processing) to automatically obtain the values of the selected parameters for inter-group comparisons. The measurements were performed 1 mm from the top of the implant, reaching its entire length. This process involved the determination of the region of interest (ROI). The collective sum of all ROIs over a contiguous set of cross-sectional image slices was used to determine the volume of interest (VOI), representing the selected 3D volume. The binarization was performed using the gray scale defined by a density of 35–150 for bone, and 150–255 for implant. All micro-CT analyzes were done by a single examiner, blinded to the experimental groups.

Statistical Analysis

All variables are presented as a function of mean values with the corresponding 95 % confidence interval (mean $\pm$ 95 % CI). Preliminary analyses have shown indistinguishable variances (Levene test, all $p > .25$). Additionally, data were collected and aligned along a

linear mixed model with fixed factors of time (7 and 30 days), systemic condition (healthy and diabetic) and surface chemistry/texture modifications (machined, DAE and NANO HA) at a random intercept. After administering a significant omnibus test, post-hoc comparison of the experimental groups means was gathered using Tukey test. The analysis was accomplished using SPSS (IBM SPSS 23, IBM Corp., Armonk, New York, USA).

Results

No postoperative infections and/or other immediate clinical concerns accompanied the surgical procedures or follow-up. All animals regained consciousness after 30 minutes post-surgery and post-operative healing was uneventful. No clinical concerns or adverse events, such as implant exposure, were detected, and a clinically healthy soft tissue aspect was observed throughout the course of the study.

Figure 1 shows the blood glucose (mg / dL) of healthy and diabetic groups at surgery day and before euthanasia. The values for the healthy (surgery: 89.55 ± 8.88 and euthanasia: 92.19 ± 9.67) and diabetic (surgery: 499.88 ± 62.27 and euthanasia: 544.63 ± 57.07) rat confirm the establishment of diabetic model.

Figures 2 and 3 showed the relative gene expression of osteogenic markers, including Runx2 (2A), Alp (2B), Opn (2C), Oc (2D), Rank (3A), RankL (3B) and Opg (3C), detected by qRT-PCR after 7 and 30 days. Diabetic NANO 7 days and healthy NANO 30 days presented for Runx2 (figure 2A)(diabetic NANO 7 days: 1.78 and healthy NANO 30 days: 4.59) ($p < 0.035$), Alp (figure 2B) (diabetic NANO 7 days: 2.57 and healthy NANO 30 days: 2.44) ($p < 0.001$) and Opn (figure 2C) (diabetic NANO 7 days: 1.55 and healthy NANO 30 days: 0.20) ($p < 0.001$) statistically significant differences when compared to machined and DAE. Additionally, diabetic NANO 7 days depicted statistically significant differences for Oc (3.38) ($p < 0.001$) (figure 2D) and Rank (1.84) ($p < 0.001$) (figure 3A) related to other

experimental groups. No statistically significant differences were found for Rankl (figure 3B) and Opg (figure 3C) however the values of diabetic NANO 7 days were equivalent to healthy DAE 7 days.

When data were evaluated as a function of implant surface, Runx2 (NANO: 2.23, DAE: 1.52 and machined: 0.58), Alp (NANO: 1.70, DAE: 1.03 and machined: 0.48), and Opn (NANO: 1.13, DAE: 0.77 and machined: 0.49) showed higher gene expression in NANO group when compared to machined and DAE ($p < 0.001$) (figure 4 A-C).

The percentage of BV/TV showed statistically significant differences for NANO group irrespective of systemic condition and time point (healthy NANO 7 days: 18,51 %, healthy NANO 30 days: 23,20 %, diabetic NANO 7 days: 18,20 %, and diabetic NANO 30 days: 23,95 %) ($p < 0.001$) (figure 5A). At 7 days, BIC (healthy: 32,34 % and diabetic: 29,47 %) ($p < 0.046$) (figure 5B), BS/BV (healthy: 109,87 mm) ($p = 0.003$) (figure 5C) and Po.To (healthy: 86,90 % and diabetic: 83,87 %) ($p < 0.022$) (figure 5D) depicted statistically significant differences for NANO HA when compared to machined and DAE. At 30 day time point NANO surface revealed statistically significant differences for BIC (healthy: 49,30 %) ($p < 0.046$) and Po.To (diabetic: 83,87 %) ($p < 0.022$) related to machined and DAE (Figures 5B and 5D).

When data were evaluated as a function of implant surface, all micro-CT parameters: BV/TV (NANO: 20,97 %, DAE: 18,36 % and machined: 16,60 %), BIC (NANO: 38,52 %, DAE: 32,69 % and machined: 26,60 %), BS/BV (NANO: 95,28 mm, DAE: 86,55 mm and machined: 85,25 mm) and Po.To (NANO: 84,39 %, DAE: 80,57 % and machined: 80,22 %) presented statistically significant differences for NANO surface when compared to machined and DAE ($p < 0.001$) (Figure 6 A-C).

The representative 3D reconstructed images with a focus on the interfacial bone formation on the implants surface in machined, DAE and NANO groups, at 7 and 30 days,

and in healthy and diabetic rats is shown in Figure 7. From the image, significant bone formation can be observed at the implant interface in the NANO group in all time point evaluations and systemic condition.

Discussion

Today, dental implants are one of the restorative methods to replace missing teeth. Improvements in implant design, surface characteristics, and surgical protocols made implants a secure and highly predictable procedure, with a mean survival rate of 94.6 % and a mean success rate of 89.7 % after more than 10 years (23). In this study, the effects of nanostructured hydroxyapatite coated implant surface were observed after 7 and 30 days, in healthy and diabetic rats (as a model of impaired bone healing).

Previous studies have also confirmed the influence of diabetes mellitus on implant osseointegration in experimental diabetic models (24-26). These studies have shown that diabetes leads to less bone-implant contact and bone density (27, 28). The values found in the present study for healthy (surgery: 89.55 ± 8.88 and euthanasia: 92.19 ± 9.67) and diabetic (surgery: 499.88 ± 62.27 and euthanasia: 544.63 ± 57.07) rats were in agreement with literature (21). Margonar et al., 2003 used the same parameter (blood glucose levels at or above 300 mg/dL), and they suggested that more elevated blood glucose levels could lead to more severe alterations on osseointegration (21). Newly formed bone around implants was reported immature and less organized in uncontrolled diabetic rats than in non-diabetic controls, suggesting qualitative differences in newly formed bone (29).

Because the surface is the first part of the implant to interact with the host, its texture and chemical configuration have been widely investigated (11, 30, 31). Changes in surface topography of materials with similar chemical compositions may affect cell-matrix-substrate interactions by a) altered protein adsorption, fibrin clot formation, and integrin expression, b)

the topography itself, and/or c) changes in surface wettability/energy. Indeed, such aspects have been implicated as major mechanisms for controlling selective cell adhesion, signaling, differentiation, and eventual tissue formation on biomaterial surfaces (32, 33). In the present study, gene expression (Runx2, Alp and Opn) and micro-CT (BV/TV, BIC, BS/BV and Po.To) analysis revealed the superiority of NANO surface when compared to machined and DAE (data as a function of implant surface).

Surface topography structuring at the micron and nanoscale level has been developed in the field of implant research aiming to promote bone formation adjacent to, or in contact with, implant surfaces. Moreover, micron- and nanostructured commercially pure titanium surfaces may promote enhanced osteoblast adhesion, functions, bone nodule formation, and bone-to-implant contact (32-34).

Zuo et al., 2013 also pointed out that surface topography, particularly nanotopography rather than surface chemistry, played a relatively more important role in cell adhesion and proliferation (35). Previous studies depicted that biomaterial surfaces with microscale roughness can depress osteoblast proliferation however nanoscale topography tends to help the proliferation processes (36-38). In the present study, in a diabetic rat model, the nano-hydroxyapatite coating implant surface outperformed the micro- and machined surfaces, suggesting that the addition of particles of nano-hydroxyapatite significantly influenced on osseointegration.

The gene expression of Runx2, Alp, Opn and Oc, key markers of bone tissue, was used to evaluate the development of osteoblast phenotype. As extensively reported, Runx2 is the master transcriptional factor that initiates bone formation (39) and osteoblast differentiation (40). ALP is known to be a regulatory factor for matrix mineralization, and it's expressed at the early stages of osteogenesis (41). Opn is generally regarded as a multifunctional extracellular matrix protein involved in cell adhesion and migration and in the

regulation of mineral deposition (42, 43). Oc is an osteoblast-specific gene that regulates bone mineralization (44). The Opg/Rankl/Rank system plays a central role in the paracrine regulation and osteoclast function (45). Opg binds to Rankl, both secreted by osteoblasts, and prevent the Rankl binding to Rank, that is present in the osteoclast membrane, inhibiting bone resorption (46).

In the present study, a reduction in the expression of Opg at 7 days healthy NANO group was observed. This result suggests that osteoblastic cells from NANO-HA coating could increase the osteoclastic activity. However, it should not be interpreted as a possible increase in bone resorption, since several cytokines released by osteoblastic cells exert regulatory functions on osteoclasts (47). Probably, the resorption activity of osteoclasts was suppressed by high concentrations of Opg, at the molecular level, and Opg decreased the expression of osteoclastic bone resorption- related genes. This result is in agreement with the study performed by Fu et al., 2013 (48). No statistically significant differences were found for Rankl however the values of diabetic NANO 7 days were equivalent to healthy DAE 7 days.

It has been hypothesized that high levels of glucose in the blood can lead to formation of irreversible advanced glycation end product (AGEs) that can bind to receptor for advanced glycation end products (RAGE) and can accumulate on fibroblasts (49). When this occurs, there can be more destruction of connective tissue and bone because of a decrease in collagen synthesis and increase in inflammatory mediators (49). He et al., 2004 suggested that diabetes may exhibit more bone resorption because of the prolonged apoptosis of osteoblasts and decrease in bone formation (50). In the present study, some results indicated that NANO-HA surface may be less affected by these adverse effects of the high glucose environment: the levels of Runx2 (DN7d: 1.78), Alp (DN7d: 2.57), Opn (DN7d: 1.55) and Oc (DN7d: 3.38) suggests an enhancement of osteoblast proliferation, mainly at early stages of osseointegration.

Furthermore, the highly active mineralization cascade of the interfacial bone around the NANO HA coated implants can be explained from a genetic perspective. It has been reported that alkaline phosphatase expression in bone around nanostructured HA-coated implants was significantly higher when compared to non-coated surfaces (9). Since high alkaline phosphatase activity enhances osteopontin expression, which is known to be a cohesive factor for mineralization, we can suggest that HA coating was partly responsible for the enhanced bone properties.

3D evaluation with micro-CT has received considerable attention in recent years because it facilitates the observation and quantification of bone formation surrounding implants or bone substitutes in a 3D plane (51). High-resolution 3D imaging techniques, such as micro-CT, directly measure bone microarchitecture. The current study evaluated by micro-CT analysis the percent bone volume (BV/TV, %), percent intersection surface (IS/TS, %), bone surface/volume ratio (BS/BV, mm), and total porosity (To.Po, %).

In this study, the percentage of IS/TS results showed that NANO HA coating presented statistical significant difference when compared to machined and DAE, irrespective of time and systemic condition. This evidence can suggest that the new implant surface could compensate the limitations of an impaired bone-healing model. The results of this study were in agreement with other studies that demonstrate nano-scale modified titanium surface inhibited the effect of high glucose concentrations (20, 52, 53). Additionally, the hierarchical micro/nano-structured titanium surface has a favorable biocompatibility on simultaneously improving osteoblast proliferation and differentiation in diabetic serum (54).

The micro-CT analysis of BV/TV (%), BS/BV (mm) and Po.To (%) showed higher values, more organized bone patterns and higher volume densities for NANO group in all evaluated time point and irrespective of systemic condition compared to other experimental groups, but BS/BV (30 days healthy group and 7 and 30 days diabetic group), implying a more

favorable bone response in these groups. Our results are in agreement with Ajami et al., 2014 that performed a microtomography and histologic study using euglycemic and hyperglycemic rats and conclude that compromised implant integration in hyperglycemia is abrogated by the addition of nanotopographical features to an underlying microtopographically complex implant surface (20).

The 3D evaluation is a reliable method and is more accurate than histological analysis, since the evaluation includes all the acquired data (16). Vandeweghe et al., 2013 suggested that micro-CT has a strong potential to become an alternative for histological examination (16). On the other hand, is important to understand the biological responses by combining information from 2D histomorphometry and 3D evaluation. Since there exist certain biological events that cannot be observed by micro-CT, e.g. cell alignment, cell shape, localization of proteins or enzyme detection (10). Furthermore, Schouten et al., 2009 reported high discrepancy between micro-CT and histomorphometry regarding the bone volume around implants (55). In addition, the limitations of this study include the lack of a histological analysis and other periods of evaluation.

The amount of bone surrounding implants surface differed across different implant treatments, systemic condition and time. Bone formation at the implant interface was found to be higher (i.e. direct bone contact to the implant) in NANO groups irrespective of systemic condition and time. Along with image reconstruction, it was easy to observe the state of trabecular bone formation to the implant surface, which provides additional information from both qualitative and quantitative perspectives.

Conclusion

Microtomographic and gene expression analyses have shown the benefits of nano-hydroxyapatite coating implants in promote new bone formation in diabetic rats when

compared to machined and double acid etched surfaces. Thus, this surface may represent a promising alternative for replacing missing teeth in compromise subjects. Clinical studies are warranted to better confirm this benefits in humans.

Acknowledgements

Fabíola Singaretti de Oliveira, Adriana Luisa Gonçalves de Almeida, Milla Sprone Tavares and Roger Rodrigo Fernandes are acknowledged for their technical assistance during the experiments.

Funding

This research was supported by the State of Sao Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil) (grant numbers: 2015/09879-0 and 2016/14584-2) and the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) (grant number: 446840/2014-9).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest associated with this study.

References

1. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52(2):155-70.
2. Chuang SK, Tian L, Wei LJ, Dodson TB. Kaplan-Meier analysis of dental implant survival: a strategy for estimating survival with clustered observations. *J Dent Res*. 2001;80(11):2016-20.
3. Expert Committee on the D, Classification of Diabetes M. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2000;23 Suppl 1:S4-19.
4. Retzepi M, Donos N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(7):673-81.
5. Courtney MW, Jr., Snider TN, Cottrell DA. Dental implant placement in type II diabetics: a review of the literature. *J Mass Dent Soc*. 2010;59(1):12-4.
6. Farzad P, Andersson L, Nyberg J. Dental implant treatment in diabetic patients. *Implant Dent*. 2002;11(3):262-7.
7. Fiorellini JP, Nevins ML. Dental implant considerations in the diabetic patient. *Periodontol* 2000. 2000;23:73-7.
8. Papalexiou V, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Souza SS, Taba M, Jr., Kajiwarra JK. Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(1):44-53.
9. Jimbo R, Xue Y, Hayashi M, Schwartz-Filho HO, Andersson M, Mustafa K, et al. Genetic responses to nanostructured calcium-phosphate-coated implants. *J Dent Res*. 2011;90(12):1422-7.
10. Jimbo R, Coelho PG, Vandeweghe S, Schwartz-Filho HO, Hayashi M, Ono D, et al. Histological and three-dimensional evaluation of osseointegration to nanostructured calcium phosphate-coated implants. *Acta Biomater*. 2011;7(12):4229-34.
11. Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G, et al. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;88(2):579-96.
12. Gittens RA, McLachlan T, Olivares-Navarrete R, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R, et al. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*. 2011;32(13):3395-403.
13. Meirelles L, Arvidsson A, Albrektsson T, Wennerberg A. Increased bone formation to unstable nano rough titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(3):326-32.
14. Goodman WG, Hori MT. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes*. 1984;33(9):825-31.
15. Swain MV, Xue J. State of the art of Micro-CT applications in dental research. *Int J Oral Sci*. 2009;1(4):177-88.
16. Vandeweghe S, Coelho PG, Vanhove C, Wennerberg A, Jimbo R. Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: a comparison with histomorphometry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(7):1259-66.
17. Li Z, Kuhn G, von Salis-Soglio M, Cooke SJ, Schirmer M, Muller R, et al. In vivo monitoring of bone architecture and remodeling after implant insertion: The different responses of cortical and trabecular bone. *Bone*. 2015;81:468-77.

18. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 1989;4(1):3-11.
19. Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone.* 1997;20(4):315-28.
20. Ajami E, Mahno E, Mendes VC, Bell S, Moineddin R, Davies JE. Bone healing and the effect of implant surface topography on osteoconduction in hyperglycemia. *Acta Biomater.* 2014;10(1):394-405.
21. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba j R, Marcantonio j E. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent.* 2003;12(4):333-9.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
23. Moraschini V, Poubel LA, Ferreira VF, Barboza Edos S. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(3):377-88.
24. Takeshita F, Iyama S, Ayukawa Y, Kido MA, Murai K, Suetsugu T. The effects of diabetes on the interface between hydroxyapatite implants and bone in rat tibia. *J Periodontol.* 1997;68(2):180-5.
25. McCracken M, Lemons JE, Rahemtulla F, Prince CW, Feldman D. Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15(3):345-54.
26. Iyama S, Takeshita F, Ayukawa Y, Kido MA, Suetsugu T, Tanaka T. A study of the regional distribution of bone formed around hydroxyapatite implants in the tibiae of streptozotocin-induced diabetic rats using multiple fluorescent labeling and confocal laser scanning microscopy. *J Periodontol.* 1997;68(12):1169-75.
27. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992;7(1):62-71.
28. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1987;2(2):69-75.
29. Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998;13(5):620-9.
30. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont.* 2004;17(5):544-64.
31. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004;17(5):536-43.
32. Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater.* 2003;6:22-7.
33. 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.
34. Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Albandar JM, Hall J, Wikesjo UM. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite) oral implants in type IV bone. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(1):105-11.

35. Zuo J, Huang X, Zhong X, Zhu B, Sun Q, Jin C, et al. A comparative study of the influence of three pure titanium plates with different micro- and nanotopographic surfaces on preosteoblast behaviors. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(11):3278-84.
36. Kubo K, Tsukimura N, Iwasa F, Ueno T, Saruwatari L, Aita H, et al. Cellular behavior on TiO₂ nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model. *Biomaterials*. 2009;30(29):5319-29.
37. Zhuang XM, Zhou B, Ouyang JL, Sun HP, Wu YL, Liu Q, et al. Enhanced MC3T3-E1 preosteoblast response and bone formation on the addition of nano-needle and nanoporous features to microtopographical titanium surfaces. *Biomed Mater*. 2014;9(4):045001.
38. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Cheng A, Anderson DM, McLachlan T, Stephan I, et al. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomater*. 2013;9(4):6268-77.
39. Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, et al. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006;7(1-2):1-16.
40. Komori T, Kishimoto T. Cbfa1 in bone development. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8(4):494-9.
41. Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris)*. 2009;57(4):318-23.
42. Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:723-49.
43. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol*. 2000;19(7):615-22.
44. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996;382(6590):448-52.
45. Blair JM, Zhou H, Seibel MJ, Dunstan CR. Mechanisms of disease: roles of OPG, RANKL and RANK in the pathophysiology of skeletal metastasis. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006;3(1):41-9.
46. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5.
47. Petri AD, Teixeira LN, Crippa GE, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Braz Dent J*. 2010;21(6):491-8.
48. Fu YX, Gu JH, Zhang YR, Tong XS, Zhao HY, Yuan Y, et al. Osteoprotegerin influences the bone resorption activity of osteoclasts. *Int J Mol Med*. 2013;31(6):1411-7.
49. Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontol* 2000. 2000;23:50-62.
50. He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology*. 2004;145(1):447-52.
51. 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.

52. Ajami E, Bell S, Liddell RS, Davies JE. Early bone anchorage to micro- and nano-topographically complex implant surfaces in hyperglycemia. *Acta Biomater.* 2016;39:169-79.
53. Ma XY, Feng YF, Wang TS, Lei W, Li X, Zhou DP, et al. Involvement of FAK-mediated BMP-2/Smad pathway in mediating osteoblast adhesion and differentiation on nano-HA/chitosan composite coated titanium implant under diabetic conditions. *Biomater Sci.* 2017;6(1):225-38.
54. Jiang H, Ma X, Zhou W, Dong K, Rausch-Fan X, Liu S, et al. The Effects of Hierarchical Micro/Nano-Structured Titanium Surface on Osteoblast Proliferation and Differentiation Under Diabetic Conditions. *Implant Dent.* 2017;26(2):263-9.
55. Schouten C, Meijer GJ, van den Beucken JJ, Spauwen PH, Jansen JA. The quantitative assessment of peri-implant bone responses using histomorphometry and micro-computed tomography. *Biomaterials.* 2009;30(27):4539-49.

Figures and legends

Figure 1. Blood glucose (mg/dL) of healthy and diabetic groups at surgery day and before euthanasia.

Figure 2. A-D. Relative gene expression of osteogenic markers: Runx2, Alp, Opn and Oc when all factors were collapsed. Identical letters indicate no significant difference among groups.

Figure 3. A-C. Relative gene expression of osteogenic markers: Rank, Rankl and Opg when all factors were collapsed. Identical letters indicate no significant difference among groups.

Figure 4. A-C. Runx2, Alp and Opn as a function of implant surface. Identical letters indicate no significant difference among groups.

Figure 5. A-D. Microtomography evaluated parameters (BV/TV, BIC, BS/BV and Po.To) when all factors were collapsed. Identical letters indicate no significant difference among groups.

Figure 6. A-C. BV/TV, BIC, BS/BV and Po.To as a function of implant surface. Identical letters indicate no significant difference among groups.

Figure 7. (A-L). The representative 3D reconstructed images with a focus on the interfacial bone formation on implants surface of machined (A, D, G, J), DAE (B, E, H, K) and NANO (C, F, I, L) groups in healthy (A-C and G-I) and diabetic (D-F and J-L) rats at 7 (A-F) and 30 (G-L) days. From the images, significant bone formation can be observed at the implant interface in the NANO group in all time point evaluation and systemic condition.