FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

RAQUEL REZENDE MARTINS DE BARROS

**A influência da superfície bioativa de implante na
osseointegração. Estudo comparativo em cães**

Ribeirão Preto
2009

RAQUEL REZENDE MARTINS DE BARROS

**A influência da superfície bioativa de implante na
osseointegração. Estudo comparativo em cães**

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

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr.

Ribeirão Preto

2009

Barros, Raquel Rezende Martins de

A influência da superfície bioativa de implante na osseointegração. Estudo comparativo em cães. Ribeirão Preto, 2009.

115p.: il.; 30cm

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

Orientador: Novaes Júnior, Arthur Belém.

1. implantes dentários. 2. osseointegração. 3. tratamento de superfícies. 4. microscopia de fluorescência. 5. microscopia confocal

Nome: BARROS, R.R.M.

Título: A influência da superfície bioativa de implante na osseointegração.

Estudo comparativo em cães.

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao Fernando

Pela magia do encontro e, desde então, pela força e felicidade de estarmos sempre juntos

Pelo seu jeito simples de conduzir a vida e principalmente pela generosidade ímpar em cuidar da minha

Na certeza de que a perfeita união se conquista quando o brilho de uma das partes não ofusca e não amedronta o brilhar da outra parte, mas incentiva e garante a construção de pessoas melhores. Pela sintonia invejável que compartilhamos.

A você, dedico esta tese não pelo trabalho em si, mas por tudo aquilo de nobre que dele transcendeu e que você merece tanto quanto eu.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais Antonio Cesar e Marilza,

Pelas pequenas coisas... e pelas grandes coisas. Mas, principalmente, pela humildade em tratá-las com a mesma importância, encontrando a completa felicidade em quaisquer que sejam.

Pela minha vida e por tudo que dela se faz possível.

Por serem pra mim os maiores e mais eternos exemplos a seguir.

Ao meu orientador Arthur,

Pela confiança e pelo trabalho, chaves indispensáveis para o crescimento.

Que as suas idéias criativas, atuais e inovadoras possam continuar transformando a vida de tantos outros alunos, como foi com a minha.

Despertando muito mais que um interesse pela pesquisa... mas um verdadeiro compromisso para com ela, no sentido de que a sempre uma forma de se aperfeiçoar.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Pela disciplina e pela força de vontade, virtudes “perturbadoras” sempre presentes na minha vida e, não por acaso, nas minhas conquistas.

Aos meus irmãos Henrique e Ricardo,

Pelo amor e alegria que temos um pelo outro.

Pelo orgulho que tenho de vocês.

À minha “irmãzinha” Renata,

Por ser esta doce forma de determinação.

À minha querida e fiel companheira Cacau,

Para qual poucos minutos a distância já justificam o morrer de saudades de quem se ama. Por nos provar, com toda naturalidade, como a vida pode ser simples e divertida, cheia de carinhos e brincadeiras.

A toda minha família, representada pelos meus eternos e queridíssimos avós Edison e Maria Amélia, Lourdes e José.

A todos os meus amigos, que tenho cada um dos nomes guardados no meu coração,

A vida não teria a menor graça e nenhum sentido sem cada um de vocês.

A FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de doutorado.

Ao meu orientador italiano Adriano Piattelli e às minhas amigas italianas Giovanna, Vittoria e Bruna,

Pela oportunidade e acolhida em seu país que tornaram possível a realização de um sonho.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de Estágio de Doutorado no Exterior.

A Vula e Guilherme, pelo incentivo e pelas boas risadas de sempre, pela diferença e importância que foi tê-los como melhores amigos.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste e de outros trabalhos... os professores Sérgio, Daniela, Mário, Márcio e Valdir, as minhas “calourinhas” Adriana, Flávia e Germana, as secretárias do departamento Tatiane e Dulce, os veterinários André e Fábio e os funcionários do biotério Aldo e Edson.

SUMÁRIO

Artigo 1

Resumo	11
Introdução	13
Materiais e Métodos	16
Resultados	22
Discussão	24
Conclusão	28
Referências bibliográficas	29

Artigo 2

Resumo	33
Introdução	35
Materiais e Métodos	39
Resultados	46
Discussão	48
Conclusão	53
Referências bibliográficas	54

Figuras e Tabelas	57
--------------------------	-----------

Anexos

Artigo 1 em inglês	71
Artigo 2 em inglês	92

A presente tese de doutorado deu origem a dois artigos científicos. O primeiro foi publicado na revista ***Brazilian Dental Journal***, e o segundo aceito para publicação na revista ***Titanium- The International Journal of Dental Implants and Biomaterials***.

ARTIGO 1

A influência da superfície bioativa de implante na osseointegração. Estudo histomorfométrico em cães

RESUMO

Barros, R.R.M. (2009). *A influência da superfície bioativa de implante na osseointegração. Estudo histomorfométrico em cães*. Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Entre as diferentes propriedades de uma superfície capazes de influenciar a deposição óssea ao redor de implantes, suas composições químicas e bioquímicas podem interferir no processo de reconhecimento a partir do tecido ósseo circundante. O presente trabalho se propôs a investigar se a funcionalização de superfícies de implante poderia influenciar a deposição óssea ao redor de implantes em um modelo animal. Neste contexto quatro superfícies experimentais diferentes, porém preparadas a partir de uma mesma microtopografia rugosa, foram testadas entre si, sendo duas bioativas, uma contendo apenas o veículo de adsorção do peptídeo e uma apenas tratada com jateamento e ataque ácido para microtexturização. Metodologicamente, os pré-molares mandibulares bilaterais de 8 cães foram extraídos e após 12 semanas, foram instalados 6 implantes em cada cão, constituindo uma amostra de 48 implantes. Com o período de osseointegração de 8 semanas a análise histomorfométrica revelou que a superfície microtexturizada modificada pela

adição de uma baixa concentração peptídica obteve maior densidade óssea adjacente ($54,6 \pm 16,6\%$) quando comparada aos outros grupos (microtexturizada + veículo de hidroxiapatita = $46,0 \pm 21,0\%$, somente microtexturizada = $45,3 \pm 11,3\%$ e microtexturizada com adição de alta concentração peptídica = $40,7 \pm 15,3\%$), no entanto estas diferenças numéricas não foram estatisticamente significantes ($p>0,05$). Assim, conclui-se que a funcionalização da superfície de implantes pode interferir na aposição óssea, em particular na densidade óssea, ressaltando que diferentes concentrações peptídicas podem conduzir a diferentes resultados.

INTRODUÇÃO

O conhecimento concernente aos implantes dentais osseointegráveis expandiu rapidamente nos últimos anos, tornando-os uma excelente alternativa terapêutica na substituição de elementos dentais perdidos, ao demonstrar alta previsibilidade de resultados e consequentemente alto índice de sucesso¹. Grande parte deste avanço pode ser explicado pelo desenvolvimento das superfícies dos mesmos, as quais conduziram a melhor ancoragem através de formação óssea superior²⁻⁴.

Sendo um fator crítico para obtenção de osseointegração, a qualidade da superfície de implantes continua sob constante investigação. Dentre as diferentes propriedades das superfícies capazes de influenciar a aposição óssea ao redor dos implantes de titânio, a topografia já foi intensamente explorada. Reconheceu-se, portanto, que as superfícies microtexturizadas oferecem taxas de sucesso superiores quando comparadas às superfícies lisas ou usinadas². Aumentos na migração e na proliferação celular⁵, somados a maior aposição óssea⁶ e a maior contato osso-implante^{7,8} são alguns dos achados de estudos *in vitro* e *in vivo* que apontam a superioridade das superfícies microtexturizadas. Adicionalmente, outros estudos^{9,10} mostraram que implantes com superfícies rugosas requerem um torque elevado para remoção quando comparados àqueles de superfícies lisas. Em sintonia com estes bons resultados, observou-se que os implantes rugosos possuem vantagens inclusive quando utilizados sob o protocolo de carga funcional imediata¹¹.

A interação entre osso e implante é, no entanto, muito complexa e não depende exclusivamente da topografia da superfície dos implantes. A

composição química e bioquímica da superfície dos implantes também detém um papel crucial nos eventos primários de formação óssea^{12,13}. Desta forma, tem sido sugerido que a funcionalização das superfícies de implantes pode interferir na aceitação e no mecanismo de união entre implante e estrutura óssea circundante. Espera-se que superfícies bioativas, as quais procuram simular parte do ambiente tecidual ósseo, possam melhorar o desempenho dos implantes dentais, estimulando sua resposta biológica inicial¹⁴.

O tecido ósseo é um arcabouço interessante no qual um grande componente mineral coexiste em íntimo contato com o colágeno. O colágeno representa mais de 90% da estrutura espacial do osso e é o maior regulador de adesão celular^{15,16} e de diferenciação osteogênica^{17,18}, podendo servir como um condutor de vários sinais bioquímicos e biomecânicos entre células. Recentemente, alguns estudos focalizaram os mecanismos de interação entre as proteínas da matriz extracelular e os receptores de membrana das células^{19,20}. Várias destas biomoléculas (proteínas nativas e peptídeos sintéticos) foram reconhecidas pela capacidade de controlar a adesão e o crescimento celular. Neste contexto, a sequência peptídica arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), via receptores de membrana celular, pode ser citada como um dos mecanismos de adesão de osteoblastos mais investigados²¹, e, portanto, a sua utilização como peptídeo candidato para melhorar a adesão celular sobre superfícies de biomateriais vem sendo sugerida²².

Presumindo que o recrutamento celular sobre uma superfície de um biomaterial é passo fundamental dentro do multifacetado processo de osseointegração, encontram-se como participantes proteínas que compõe a matriz extracelular, citoesqueleto e membrana celular¹⁴. Neste contexto,

sugere-se que a funcionalização das superfícies de implantes, através da associação de fatores de adesão celular, poderia interferir na aceitação e na própria união entre o implante e o tecido ósseo circundante. Em outras palavras, espera-se que superfícies bioativas que mimetizam o ambiente tecidual ósseo possam melhorar o desempenho dos implantes dentais, favorecendo a resposta biológica inicial.

O objetivo do presente estudo histomorfométrico foi investigar se superfícies bioativas de implante, criadas a partir de uma base microtexturizada através da adição de baixa ou alta concentração peptídica, influenciam o contato entre osso e implante e a densidade óssea ao redor de implantes dentais instalados em mandíbulas de cães, estabelecendo uma comparação entre as mesmas e com superfícies microtexturizadas obtidas através do processo de jateamento associado ao ataque ácido, porém bioinertes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho e Manufatura dos Implantes

Os implantes foram manufaturados a partir de titânio comercial puro, seguindo o desenho do implante XIVE (Friadent, GmbH Mannheim, Germany), com 4,5 mm de largura por 9,5 mm de comprimento. Particularmente, para este estudo os implantes foram caracterizados com uma endentação realizada a 2,3 mm do topo do implante, com 0,18 mm de profundidade e 1,5 mm de comprimento (figura 1; p. 58). Exatamente no perímetro desta endentação foram aplicados os diferentes tipos de tratamento de superfície avaliados na presente pesquisa, os quais constituíram os quatro diferentes grupos de estudo nomeados “A”, “B”, “C” e “D” (tabela 1; p. 67). Para constituição destas superfícies, em um primeiro estágio, as endentações de todos os grupos foram preparadas com jateamento e ataque ácido, ou seja, produzindo superfícies microtexturizadas, comercialmente denominadas PLUS (Friadent, GmbH Mannheim, Germany). Para funcionalização, um peptídeo bioativo foi adsorvido em coberturas de hidroxiapatita. Este peptídeo bioativo pode ser também descrito como uma sequência de aminoácidos relacionada à formação óssea; entretanto a divulgação da exata composição do mesmo ainda não foi autorizada pelo fabricante (“proprietary processing”). Resumidamente, no grupo “A” a hidroxiapatita nanocristalina (HA) associada ao peptídeo bioativo em “baixa concentração” (20 µg/mL) foi adicionada à morfologia da superfície PLUS; similarmente no grupo “D”, o mesmo tratamento foi realizado, porém utilizando uma “alta concentração” (200 µg/mL) do peptídeo bioativo. Para avaliar uma possível interferência da utilização da hidroxiapatita nanocristalina como intermediário, no grupo “B” uma cobertura da mesma foi realizada após o

desenvolvimento da superfície PLUS. Finalmente no grupo “C”, as endentações foram preparadas somente para constituir a superfície microtexturizada PLUS. É muito importante enfatizar que o processo de funcionalização das superfícies não modificou a morfologia rugosa da superfície PLUS, ao menos em uma escala micrométrica. Nesta, a morfologia da superfície PLUS foi mantida após a adição da HA associada ou não ao peptídeo como demonstrado nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (figura 2; p.58).

Este estudo foi duplo cego, o que significa que os grupos e as diferentes constituições de suas endentações não foram revelados a nenhum dos profissionais envolvidos, do cirurgião ao responsável pela leitura das lâminas para histomorfometria. Tais informações só foram divulgadas após a conclusão das análises histomorfométrica e estatística.

Procedimentos Cirúrgicos

O protocolo desta pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto (# 04.1.662.53-0).

Foram selecionados oito cães machos, adultos jovens, sem raça definida, que pesavam aproximadamente 12 Kg. Estes animais apresentavam maxila e mandíbula intatas, não apresentavam trauma oclusal e nem mesmo lesões virais ou fúngicas, encontravam-se em bom estado de saúde geral. Mais especificamente, nenhum envolvimento sistêmico relevante foi diagnosticado nos animais de acordo com o médico-veterinário responsável pela pesquisa.

Cada cão foi submetido a duas intervenções cirúrgicas. Nas primeiras cirurgias, após a aplicação intramuscular de sedativo e relaxante muscular (2%

Rompum, 20 mg/kg, 0.5 ml/10 kg - Rompum® – Bayer do Brasil S/A, São Paulo, SP, Brasil), os cães foram anestesiados pelo método de anestesia dissociativa (aplicação intravenosa de tiopental sódico 1mL/Kg; 20 mg/kg de tiopental diluído em 50 mL de solução salina - ABBOTT Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, uma adequada assepsia da cavidade bucal e anestesia local precederam os procedimentos de incisão intra-sulcular e elevação de retalhos mucoperiosteais bilaterais realizados do primeiro ao quarto pré-molares mandibulares. Os dentes foram seccionados ao meio, no sentido vestibulo-lingual, acompanhando a região de bifurcação. Tal manobra permite a extração individual das raízes mesial e distal, com o intuito de não danificar as paredes ósseas alveolares. Por fim, os retalhos foram reposicionados e suturados com fio não-absorvível de seda 4.0 (Ethicon; Johnson & Johnson do Brasil, São José dos Campos, SP, Brasil). Uma semana após, os animais foram avaliados e cuidadosa assepsia da cavidade oral e remoção das suturas foram executadas.

Para a realização das segundas intervenções cirúrgicas observou-se o período cicatricial de três meses. Os animais receberam 20000 UI de penicilina e estreptomicina (1g/10Kg) (Baytril; E.H.G. Agrofarma, Mogi Mirim, SP, Brasil) na noite anterior aos procedimentos cirúrgicos. Considerando que esta dose provê uma cobertura antibiótica de amplo espectro por quatro dias, uma nova dose foi aplicada após este período para se completar uma semana de efeito após a cirurgia. Os procedimentos de sedação e anestesia dissociativa foram repetidos e incisões horizontais sobre a crista dos rebordos foram realizadas estendendo-se da distal do canino à região mesial do primeiro molar (figura 3A; p.59). Após a elevação de retalhos mucoperiosteais, se observou a completa

cicatrização dos alvéolos (figura 3B; p.59). A primeira perfuração foi realizada para distar 5 mm do molar ao final de sua realização; a partir desta o rebordo foi mensurado e dividido de forma que as outras perfurações distassem pelo menos 5 mm umas das outras, sobrando uma distância ainda maior do canino que possui uma raiz muito volumosa e inclinada. Os três implantes foram aleatoriamente posicionados em cada hemi-mandíbula de cada animal (figuras 3C,3D e 3E; p.59) e esta aleatorização foi realizada a partir de uma tabela previamente gerada por um programa de computador (tabela 2; p.68), que permitiu que os diferentes implantes fossem instalados com diferentes seqüências em cada lado da mandíbula dos diferentes animais. Ao todo 48 implantes foram utilizados neste experimento, sendo doze implantes de cada grupo de estudo. Por fim, os retalhos foram reposicionados e suturados com fio não-absorvível e, portanto, a cicatrização dos implantes aconteceu de forma submersa (figura 3F; p.59).

Os animais foram mantidos com dieta leve e pastosa por pelo menos 14 dias, quando as suturas foram removidas. A cicatrização das regiões operadas foi acompanhada periodicamente e os dentes remanescentes receberam controle de placa, inclusive com a utilização de pontas ultra-sônicas, mensalmente.

Sacrifício e Processamento Histológico

Oito semanas após a colocação dos implantes, os animais foram sedados e sacrificados com “overdose” de tiopental. As hemi-mandíbulas foram dissecadas, removidas, reduzidas e fixadas em formalina a 4% em pH 7 por dez dias. Os espécimes foram transferidos para uma solução de 70% de álcool

e, então, desidratados em concentrações ascendentes de etanol até atingir a concentração de 100%. Em seguida, foram infiltrados e incluídos em resina LR White (London Resin Company, Berkshire, England). Os blocos foram seccionados pela técnica de secção de tecidos duros descrita por Donath & Breuner (1982)²³. Tais conjuntos foram preparados e a partir deles foram obtidas lâminas histológicas, as quais foram coradas com *Stevenel's blue* e *Alizarin red S* para análise histomorfométrica em microscópio de luz (figura 4; p.60).

Análise Histomorfométrica

Secções histológicas longitudinais de cada implante foram capturadas através de uma câmera de vídeo Leica DC 300F (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany) acoplada a um microscópio Leica MZFL III (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany). As imagens foram analisadas no programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA) com o intuito de determinar as porcentagens de contato osso-implante (COI) e a densidade óssea na região determinada pelas endentações.

As medidas lineares das porcentagens de osso mineralizado em contato direto com a superfície do implante (COI) foram realizadas na área definida pelas endentações²⁴.

A densidade óssea foi determinada dentro de retângulos, sendo um posicionado dentro da endentação e ocupando toda a sua área (DOA) e o outro fora da endentação como imagem em espelho do primeiro (DOD). Desta forma, foi possível avaliar a densidade óssea das áreas adjacentes à superfície do implante (DOA) separadamente das áreas distantes (DOD). Para estas

medidas a porcentagem de osso mineralizado e a porcentagem de espaços medulares foram relacionadas.

Um único examinador que não possuía informações sobre os diferentes grupos de estudo interpretou as imagens e realizou todas as medidas.

Análise Estatística

Os valores obtidos para o percentual de contato osso-implante e para densidade óssea adjacente e distante foram analisados estatisticamente em um modelo linear misto para múltiplas variáveis e também através do *standard two-sample t-Test* para uma única variável. No modelo linear misto, utilizando o software SAS/STAT (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) foi feita uma análise de covariância com o intuito de avaliar repetidamente os resultados encontrados nas diferentes hemi-mandíbulas com as diferentes superfícies ou grupos. Tais avaliações foram também realizadas dentro de cada animal utilizando o teste de Tukey ajustado para comparação de múltiplos valores médios. Finalmente, o *two-sample t-Test* independente foi aplicado entre as médias de cada diferente superfície utilizando o software SPSS (SPSS GmbH Software, München, Germany). O nível de confiança assumido foi de 95%.

RESULTADOS

Nenhuma intercorrência foi observada em qualquer dos animais durante o período pós-operatório de oito semanas após a instalação dos implantes. Em especial, as regiões envolvidas na pesquisa não apresentaram sinais significativos de inflamação. Nas radiografias tomadas imediatamente antes do sacrifício para auxiliar a direção dos cortes de redução das mandíbulas, foram observadas estruturas ósseas condizentes com a normalidade e, assim, foi possível analisar histomorfometricamente toda a amostra de 48 implantes, sendo 12 espécimes de cada grupo de estudo.

Observações Histológicas

Nas interfaces de contato osso-implante foi observada matriz óssea mineralizada em íntimo contato com as superfícies dos implantes nos quatro grupos experimentais (figura 4; p.60).

O tecido ósseo foi caracterizado pela presença de formações lamelares concêntricas e paralelas. As cavidades medulares exibiram diferentes diâmetros, os quais estavam revestidos por endóstio e que, em alguns pontos, encontravam-se em contato com a superfície do implante (figura 4; p.60).

Achados Histomorfométricos

Após a realização de todas as medidas histomorfométricas de cada espécime, os grupos experimentais “A”, “B”, “C” e “D” foram revelados (tabela 1; p.67) e os dados foram devidamente tabulados. Quanto à porcentagem de contato osso-implante no interior das endentações (tabela 3; p.69) (figura 5; p.61), o grupo “D” apresentou o valor médio mais alto de $65,4 \pm 17,1\%$

(variando de 20,8% a 88,5%). Em segundo lugar, o grupo “B” apresentou uma média de COI de $62,4 \pm 17,4\%$ (variando de 28,9% a 96,2%), seguido pelo grupo “A” com $60,4 \pm 17,5\%$ (variando de 28,1% a 90,5%). Finalmente, o grupo “C” apresentou o menor valor percentual médio de COI de $58,0 \pm 11,8\%$ variando de 38,7% a 72,5%. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (tabela 4; p.70) (figura 5; p.61) ($p>0,05$).

Quanto à densidade óssea, em relação às áreas adjacentes, o grupo “A” apresentou o maior valor percentual de $54,6 \pm 16,6\%$ (variando de 30,8% a 78,9%). O grupo “B” obteve o valor de $46,0 \pm 21,0\%$ (variando de 16,1% a 87,7%), o grupo “C” de $45,3 \pm 11,3\%$ (variando de 28,4% a 62,4%) e o grupo “D” de $40,7 \pm 15,3\%$ (variando de 17,4% a 64,0%) (tabela 3; p.69), e apesar das diferenças numéricas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (tabela 4; p.70) (figura 5; p.61) ($p>0,05$). As análises da densidade óssea nas áreas distantes às superfícies do implante mostraram os seguintes valores: $47,0 \pm 16,8\%$ (variando de 15,2% a 68,9%) para o grupo “A”; $44,9 \pm 17,5\%$ (variando de 16,5% a 87,0%) para o grupo “B”; $44,6 \pm 14,6\%$ (variando de 21,8% a 75,6%) para o grupo “C” e $41,4 \pm 18,7\%$ (variando de 12,7% a 68,4%) para o grupo “D” (tabela 3; p.69), sendo que novamente não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (tabela 4; p.70) (figura 5; p.61) ($p>0,05$).

DISCUSSÃO

A preparação de superfícies bioativas através da inclusão de mecanismos que favorecem a adesão celular é mais uma modificação tecnológica que objetiva melhorar a integração dos implantes.

A adesão celular é um evento fundamental e diretamente relacionado ao crescimento celular, migração e diferenciação celular. Pode afetar a embriogênese, a manutenção da integridade tecidual, o processo cicatricial, a resposta imune e a integração entre tecido e biomaterial. Diversas proteínas estão envolvidas na adesão celular, como aquelas da matriz extracelular (colágeno, fibronectina, vitronectina) e receptores de membrana (integrinas). As interações entre estas proteínas e seus receptores específicos induzem sinais de transdução e conseqüentemente influenciam o crescimento e a diferenciação celular¹⁹.

O desenvolvimento da interface implante-osso depende da interação direta da matriz óssea, e primeiramente dos osteoblastos, com o biomaterial em si. Em outras palavras, a adesão dos osteoblastos se faz essencial para que ocorra a desejada ligação entre o tecido ósseo propriamente dito e o biomaterial¹⁹.

Foi previamente demonstrado *in vitro* que a funcionalização do substrato de titânio com peptídeos sintéticos pode melhorar a adesão de células da linhagem osteoblástica de humanos¹⁴. A presença destes peptídeos sintéticos também demonstrou uma maior expressão gênica para fosfatase alcalina e para algumas proteínas ósseas morfogenéticas (BMP-2 e BMP-7). Estas proteínas ósseas morfogenéticas têm sido citadas como possíveis

estimuladoras de atividade osteoblástica através de mecanismos autócrinos e parácrinos²⁵.

No presente estudo a superfície PLUS modificada pela “baixa concentração” de um peptídeo sintético (grupo “A”) apresentou maior densidade óssea adjacente – DOA (54,6%) quando comparada com os outros grupos (grupo “B”= 46,0%, grupo “C”= 45,3% e grupo “D”= 40,7%). Estas diferenças entre os grupos foram numéricas, sem significância estatística, fato que pode ser explicado em parte pelo tamanho da amostra. A média da densidade óssea nas áreas distantes também foi superior no grupo “A”, porém não tão evidente quanto no parâmetro anterior. De acordo com os histogramas (figura 6; p.62), os quais representam a dispersão dos valores de densidade óssea adjacente para as diferentes superfícies de implantes, o grupo “A” alcançou o melhor desempenho ao ser comparado com os demais grupos. Neste grupo, 7 implantes em 12 mostraram uma DOA de 40-60%, 3 implantes atingiram valores superiores a 70% e nenhum implante mostrou índices inferiores a 30%. A presença de uma concentração superior do peptídeo sintético (200 µg/mL) não demonstrou nenhuma vantagem em relação aos resultados de densidade óssea atingidos pelo grupo “A”. Por outro lado, 6 implantes em 12 mostraram uma DOA de 40-60% no grupo “D” (superfície PLUS modificada pela “alta concentração” do peptídeo), nenhum implante neste grupo apresentou valores superiores a 70% de DOA e 3 implantes obtiveram índices inferiores a 30% de DOA. Desta forma observa-se uma tendência da concentração de peptídeo em interferir no processo de aposição óssea, já que a baixa concentração de 20 µg/mL apresentou melhores resultados do que a alta concentração de 200 µg/mL. A análise dos

histogramas também mostrou que o grupo “C” apresentou resultados inferiores quando comparado ao grupo “A”. No grupo “C”, que representa a superfície jateada com ataque ácido (superfície PLUS), 6 implantes em 12 obtiveram 40-60% de DOA, no entanto nenhum implante atingiu valores superiores a 70% de DOA e 2 implantes ficaram com índices inferiores a 30% de DOA. Finalmente, no grupo “B”, cuja constituição envolve a microtexturização via jateamento e ataque ácido somada à incorporação de hidroxiapatita nanocristalina, 5 implantes em 12 apresentaram índices de DOA entre 40 e 60%, 2 implantes alcançaram mais de 70% de DOA, porém 3 implantes ficaram com menos de 30% de DOA. Estes resultados indicam que a funcionalização pode interferir positivamente no processo de aposição óssea. Germanier et al¹² mostraram recentemente que a topografia não é a única característica da superfície de implantes capaz de melhorar a aposição óssea ao redor dos mesmos, de acordo com seu estudo *in vivo*. Paralelamente, Schuler et al¹³ mostraram *in vitro* que a química da superfície também influencia a união e a morfologia celular. Em geral, um número maior de células e um maior espreado das mesmas foram observados nos substratos bioativos (contendo RGD) quando comparados com superfícies bioinertes de acordo com seus achados. Com base nos achados do presente estudo, não foi possível descrever como atua a “baixa concentração” deste peptídeo sintético na superfície do implante durante a cicatrização óssea. Especula-se que o aprimoramento da composição bioquímica da superfície pode ter sido capaz de melhorar sua habilidade de interação com as células através de mecanismos que simulam a interação entre as células e sua matriz extracelular.

Interessantemente, a superfície modificada com a “baixa concentração” do peptídeo sintético não apresentou a maior média de contato osso-implante quando comparada com os outros grupos. Ao invés disto valores médios similares foram observados nos quatro grupos (grupo “A”=60,4%, grupo “B”=62,4%, grupo “C”=58,0% e grupo “D”=65,4%). De acordo com estes resultados pode se imaginar que o estabelecimento do contato osso-implante tenha sido influenciado em grande parte pela estrutura rugosa primária da superfície PLUS, a qual não foi alterada pelo processo de funcionalização, ao menos na escala micrométrica. No entanto, outras investigações são necessárias.

A funcionalização das superfícies de implantes é um campo de investigação vasto, porém ainda pobremente explorado. O melhoramento da densidade óssea ao redor da superfície modificada pela adição do peptídeo sintético bioativo é promissora. Outros estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para elucidar como e em qual extensão a funcionalização das superfícies de implantes poderia representar uma modificação benéfica no processo de osseointegração.

CONCLUSÃO

A funcionalização das superfícies de implante pode interferir no processo de aposição óssea, em particular na densidade óssea ao redor dos implantes e diferentes concentrações peptídicas podem conduzir a diferentes resultados.

AGRADECIMENTO

Este estudo foi parcialmente financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processos 05/60839-8 e 06/56020-6) e pela DENTSPLY Friadent.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Bränemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 1981; **10**: 387-416.
2. Cochran DL. A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol* 1999; **70**: 1523-1539.
3. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000; **2**: 120-128.
4. Ferguson SJ, Langhoff JD, Voelter K, von Rechenberg B, Scharnweber D, Bierbaum S, Schnabelrauch M, Kautz AR, Frauchiger VM, Mueller TL, van Lenthe GH, Schlottig F. Biomechanical comparison of different surface modifications for dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008; **23**: 1037-1046.
5. Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, Boyan B. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials* 2005; **26**: 1837-1847.
6. Goldberg V, Stevenson S, Feighan J, Davy D. Biology of grit-blasted titanium alloy implants. *Clin Orthop Relat Res* 1995; **319**: 122-129.
7. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991; **25**: 889-902.

8. London RM, Roberts FA, Baker DA, Rohrer MD, O'Neal RB. Histologic comparison of a thermal dual-etched implant surface to machined, TPS, and HA surfaces: bone contact in vivo in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; **17**: 369-376.
9. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Kroll JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surfaces topographies. *Clin Oral Impl Res* 1995; **6**: 24-30.
10. Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implants materials, designs, and surfaces topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; **15**: 675-690.
11. Uribe R, Penarrocha M, Balaguer J, Fulgueiras N. Immediate loading in oral implants. Present situation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; **10**: 143-153.
12. Germanier Y, Tosatti S, Brogini N, Textor M, Buser D. Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces. A histomorphometric study in miniature pigs. *Clin Oral Impl Res* 2006; **17**: 251-257.
13. Schuler M, Owen GR, Hamilton DW, de Wild M, Textor M, Brunette DM, Tosatti SG. Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. *Biomaterials* 2006; **27**: 4003-4015.
14. Bagno A, Piovan A, Dettin M, Chiarion A, Brun P, Gambaretto R, Fontana G, Di Bello C, Palu G, Castagliuolo I. Human osteoblast-like cell

- adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides. Bone 2007; **40**: 693-699.
15. Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. J Cell Biol 1981; **88**: 473-485.
16. Strom SC, Michalopoulos G. Collagen as a substrate for cell growth and differentiation. Methods Enzymol 1982; **82**: 544-555.
17. Maor G, von der Mark K, Reddi H, Heinegard D, Franzen A, Silbermann M. Acceleration of cartilage and bone differentiation on collagenous substrata. Coll Relat Res 1987; **7**: 351-370.
18. Mizuno M, Kuboki Y. TGF-beta accelerated the osteogenic differentiation of bone marrow cells induced by collagen matrix. Biochem Biophys Res Commun 1995; **211**: 1091-1098.
19. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, Hardouin P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. J Biomed Mater Res 2000; **49**: 155-166.
20. MacDonald DE, Markovic B, Allen M, Somasundaran P, Boskey AL. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. J Biomed Mater Res 1998; **41**: 120-130.
21. Xiao Y, Truskey GA. Effect of receptor-ligand affinity on the strength of endothelial cell adhesion. Biophys J 1996; **71**: 2869-2884.
22. Rezania A, Healy KE. Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells. Biotechnol Prog 1999; **15**: 19-32.

23. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. J Oral Pathol 1982; **11**: 318-326.
24. Novaes Jr AB, Souza SLS, Oliveira PT, Souza AMMS. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. Int J Oral Maxillofac Implants 2002; **17**: 377-383.
25. Ripamonti U, Reddi AH. Growth and morphogenetic factors in bone induction: role of osteogenin and related bone morphogenetic proteins in craniofacial and periodontal bone repair. Crit Rev Oral Biol Med 1992; **3**: 1-14.

ARTIGO 2

Dinâmicas da remodelação óssea ao redor de superfícies bioativas de implante. Análise de fluorescência em cães

RESUMO

Barros, R.R.M. (2009). *Dinâmicas da remodelação óssea ao redor de superfícies bioativas de implante. Análise de fluorescência em cães*. Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O objetivo deste estudo foi avaliar a remodelação óssea ao redor de diferentes superfícies de implantes em um modelo animal, a partir de uma análise de fluorescência. Para tanto, os pré-molares mandibulares bilaterais de 8 cães foram extraídos e após 12 semanas foram instalados 6 implantes em cada animal. Os 4 grupos experimentais apresentavam a mesma topografia microtexturizada, porém variando quanto à adição ou não de uma concentração de peptídeo bioativo. Durante o período cicatricial de 2 meses, uma marcação policromática fluorescente foi realizada com o intuito de investigar a dinâmica de remodelação óssea ao redor dos implantes de diferentes superfícies. Estes marcadores ósseos foram administrados no terceiro dia após a instalação dos implantes, bem como após 1, 2, 4 e 6 semanas. A nova formação de tecido ósseo foi determinada histomorfometricamente pela quantificação da fluorescência dos marcadores ósseos em áreas adjacentes e distantes às superfícies dos implantes. De forma

geral, a análise intra-grupos revelou um padrão na incorporação dos fluorocromos nos diferentes grupos. Entretanto, a comparação entre grupos demonstrou uma diferença estatisticamente significativa em favor da superfície composta pela baixa concentração do peptídeo bioativo na área adjacente aos implantes somente no período de 4 semanas ($p < 0,001$). Adicionalmente nos períodos de 3 dias e 6 semanas, este grupo também apresentou valores numéricos superiores de incorporação de fluorocromos. Pode-se concluir que a remodelação óssea é um processo ativo em que as atividades de formação e reabsorção se alternam. Existe um padrão de remodelação óssea entre superfícies microtexturizadas, sendo estas funcionalizadas ou não, entretanto, aquelas com baixa concentração do peptídeo bioativo estudado favoreceram a formação óssea adjacente aos implantes quando comparadas às demais no período avaliado.

INTRODUÇÃO

A implantação de um material sintético é seguida, invariavelmente, pela formação de um biofilme proteico ao redor do mesmo¹. Neste processo, a orientação proteica será ditada pela capacidade de atração da superfície em questão. Várias características podem modificar a atividade biológica, inicialmente favorecendo uma adesão celular seletiva, e, como consequência, conduzindo à formação óssea². Em relação ao titânio, que é comumente utilizado como um metal biocompatível, logo após a usinagem é esperada a formação superficial de uma camada de óxido e a interação das células com esta será mediada pelas proteínas de superfície existentes, inclusive pelas proteínas da matriz extracelular.

Um tema comum na engenharia tecidual, em se tratando do comportamento celular frente à superfície de um dispositivo, é a possível modificação deste material para interagir seletivamente com tipos celulares específicos com base nos eventos de reconhecimento biomoleculares. Dentro deste contexto, alguns peptídeos, inclusive os encontrados nas proteínas da matriz extracelular, estão sendo estudados, para que ao serem combinados a determinados materiais possam favorecer a adesão celular através do reconhecimento de receptores de ligação^{3,4}.

De acordo com os parâmetros utilizados para avaliar a osseointegração de implantes dentais, excelentes resultados têm sido alcançados com aqueles de superfície microtexturizada obtidos através do jateamento associado ao ataque ácido⁵. Entretanto, é importante lembrar que a topografia não é a única característica de superfície capaz de influenciar a aposição óssea ao redor dos implantes de titânio. As composições químicas e bioquímicas da superfície de

um implante também podem colaborar na formação óssea ao redor de implantes, especialmente quando considerados os primeiros eventos deste processo^{1,5}. Com base em tais aspectos, a funcionalização da superfície através de diferentes peptídeos está sendo investigada recentemente.

Alguns estudos “in vitro” têm focalizado a habilidade de recrutamento celular de algumas superfícies de implante modificadas^{6,7}. Estas superfícies foram obtidas a partir de diferentes processos, freqüentemente envolvendo um tipo de funcionalização com peptídeos de adesão. Schuler et al⁷ investigaram a adesão e o espraio celular de células epiteliais, fibroblastos e osteoblastos em superfícies biomimeticamente modificadas (contendo uma sequência de peptídeos bioativos RGD), bem como em superfícies de titânio lisa e rugosa. Como grupo controle, os autores utilizaram barras de titânio e superfícies bioinertes. De forma geral, um maior número de células e um maior espraio das mesmas foi observado nos substratos bioativos (contendo RGD) quando confrontados com as superfícies bioinertes. Um maior número de fibroblastos foi observado nas superfícies lisas em comparação com as superfícies de topografia rugosa, no entanto em relação aos osteoblastos verificou-se uma tendência oposta. A adesão dos osteoblastos e as áreas de contato aumentavam conforme aumentava a densidade superficial de peptídeo-RGD. Os autores concluíram que a topografia da superfície e a sua (bio) química foram determinantes na resposta celular dos implantes.

A hipótese de que a funcionalização das superfícies de implante pode ser uma vantajosa modificação vem sendo confirmada também pelos resultados de estudos realizados em animais⁸⁻¹⁰. Park et al⁸ avaliaram a osseointegração de implantes de titânio anodizados cobertos com fator de

crescimento fibroblástico-fibronectina (FGF-FN) , os quais foram instalados em tíbias de coelhos. Tanto os valores de remoção ao torque quanto as porcentagens de contato osso-implante foram consideradas melhores para o grupo teste quando comparadas com os implantes que não haviam sido funcionalizados. Germanier et al¹⁰ compararam, por sua vez, superfícies de implantes que receberam jateamento e ataque ácido com superfícies modificadas pela incorporação de um polímero peptídico RGD, após a instalação em maxila de mini-porcos. Observaram que a funcionalização pode promover uma melhor aposição óssea durante estágios precoces da cicatrização óssea.

A marcação do osso através da incorporação de substâncias fluorescentes é um método que permite, a partir da histomorfometria óssea, um entendimento sobre a cronologia da remodelação óssea¹¹, inclusive durante estágios precoces do estabelecimento da interface osso-implante. O processo de formação óssea se inicia com a formação de uma matriz não calcificada pelos osteoblastos, a qual se mineralizará posteriormente com a deposição da apatita, e é exatamente durante esta fase de formação que os fluorocromos podem ser acumulados. De acordo com Nkenke et al¹² “durante o processo de mineralização, os corantes fluorescentes são incorporados na frente da mineralização em si por quelação”. Obtendo-se marcações em diferentes intervalos de tempo com a administração sequencial de diferentes fluorocromos pode-se sugerir a direção e a localização topográfica da formação de novo osso.

O objetivo deste estudo foi analisar a dinâmica de formação e remodelação ósseas ao redor de superfícies de implantes contendo uma baixa

concentração de um peptídeo bioativo, uma alta concentração do mesmo peptídeo bioativo, uma superfície contendo apenas o veículo de adsorção do peptídeo e, finalmente, uma superfície microtexturizada obtida pelo processo de jateamento e ataque ácido, em um modelo animal dispendo de uma análise policromática sequencial de fluorescência.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho e Manufatura dos Implantes

Os implantes foram manufaturados a partir de titânio comercial puro, seguindo o desenho do implante XIVE (Friadent, GmbH Mannheim, Germany), com 4,5 mm de largura por 9,5 mm de comprimento. Particularmente para este estudo os implantes foram caracterizados com uma endentação realizada a 2,3 mm do topo do implante, com 0,18 mm de profundidade e 1,5 mm de comprimento (figura 1; p.58). Exatamente no perímetro desta endentação foram aplicados os diferentes tipos de tratamento de superfície avaliados na presente pesquisa, os quais constituíram os quatro diferentes grupos experimentais nomeados “A”, “B”, “C” e “D” (tabela 1; p.67). Para constituição destas superfícies, em um primeiro estágio, as endentações de todos os grupos foram preparadas com jateamento e ataque ácido, ou seja, produzindo superfícies microtexturizadas, comercialmente denominadas PLUS (Friadent, GmbH Mannheim, Germany). Em dois grupos, estas regiões receberam posteriormente a adição de um peptídeo sintético em duas diferentes concentrações. Para que isto fosse possível o peptídeo foi diluído em solução de PBS para atingir as concentrações pré-determinadas de 20 e 200 µg/mL e adsorvido em coberturas de hidroxiapatita nanocristalina. Este peptídeo bioativo pode ser também descrito como uma sequência de aminoácidos relacionada à formação óssea; entretanto a divulgação da exata composição do mesmo ainda não foi autorizada pelo fabricante (“proprietary processing”). Em suma, no grupo “A” os implantes possuíam endentações microtexturizadas com a adição do veículo de hidroxiapatita nanocristalina (HA) associado ao peptídeo em “baixa concentração” (20 µg/mL). Já no grupo “D” o mesmo

tratamento descrito acima foi realizado, porém com o peptídeo na “alta concentração” (200 µg/mL). Para avaliar uma possível interferência da hidroxiapatita nanocristalina, o grupo “B” foi inserido na pesquisa e recebeu apenas esta cobertura de HA após o desenvolvimento da superfície microtexturizada. Finalmente no grupo “C”, as endentações foram preparadas apenas para constituir a superfície microtexturizada em si. É muito importante enfatizar que, segundo o fabricante dos implantes, o processo de funcionalização das superfícies através da inclusão do peptídeo bioativo não modificou a morfologia rugosa da superfície inicial, ao menos na escala micrométrica. Em outras palavras a morfologia da superfície microtexturizada foi mantida após a adição da HA associada ou não ao peptídeo como pode ser observado nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (figura 2; p.58).

Este estudo foi duplo cego, o que significa que todos os profissionais envolvidos, do cirurgião ao examinador das lâminas histológicas para análise de fluorescência, não conheciam os grupos de estudo e as diferentes constituições de suas endentações. A revelação dos grupos foi feita apenas após a conclusão das análises de fluorescência e estatística.

Procedimentos Cirúrgicos

O protocolo desta pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto (# 04.1.662.53-0).

Foram selecionados oito cães machos, adultos jovens, sem raça definida, que pesavam aproximadamente 12 Kg. Estes animais apresentavam

maxila e mandíbula intatas, não apresentavam trauma oclusal, lesões virais ou fúngicas. Apresentavam boa saúde geral e nenhum envolvimento sistêmico relevante de acordo com o médico-veterinário responsável pelo acompanhamento dos animais durante a pesquisa.

Cada cão foi submetido a duas intervenções cirúrgicas. Nas primeiras cirurgias, após a aplicação intramuscular de sedativo e relaxante muscular (2% Rompum, 20 mg/kg, 0.5 ml/10 kg - Rompum® – Bayer do Brasil S/A, São Paulo, SP, Brasil), os cães foram anestesiados pelo método de anestesia dissociativa (aplicação intravenosa de tiopental sódico 1mL/Kg; 20 mg/kg de tiopental diluído em 50 mL de solução salina - ABBOTT Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, uma adequada assepsia da cavidade bucal e anestesia local precederam os procedimentos de incisão intra-sulcular e elevação de retalhos mucoperiosteais bilaterais, os quais compreenderam a área de primeiro a quarto pré-molares mandibulares. Os dentes foram seccionados ao meio, no sentido vestibulo-lingual a partir da região de bifurcação, possibilitando a extração individual das raízes mesial e distal, e, portanto, minimizando a possibilidade de trauma às paredes ósseas alveolares. Com o término das exodontias os retalhos foram reposicionados e suturados com fio não-absorvível de seda 4.0 (Ethicon; Johnson & Johnson do Brasil, São José dos Campos, SP, Brasil). Uma semana após, os animais foram avaliados e cuidadosa assepsia da cavidade oral e remoção das suturas foram executadas.

Para a realização das segundas intervenções cirúrgicas foi aguardado o período cicatricial de três meses. Os animais receberam 20000 UI de penicilina e estreptomicina (1g/10Kg) (Baytril; E.H.G. Agrofarma, Mogi Mirim, SP, Brasil)

na noite anterior aos procedimentos cirúrgicos. Esta dose provê uma cobertura antibiótica de amplo espectro por quatro dias, sendo administrada uma nova dose após este período para prolongar o efeito por uma semana de pós-operatório. Os procedimentos de sedação e anestesia dissociativa foram os mesmos utilizados na primeira fase cirúrgica e, então, incisões horizontais sobre a crista dos rebordos foram realizadas estendendo-se da distal do canino à região mesial do primeiro molar. Após a elevação de retalhos mucoperiosteais, observou-se a completa cicatrização dos alvéolos. A primeira perfuração foi realizada para distar 5 mm do molar ao final de sua realização; a partir desta o rebordo foi mensurado e dividido de forma que as outras perfurações distassem pelo menos 5 mm umas das outras, sobrando uma distância ainda maior do canino que possui uma raiz muito volumosa e inclinada. Três implantes foram aleatoriamente posicionados em cada hemimandíbula de cada animal, obedecendo a uma tabela de aleatorização que permitiu que os diferentes implantes fossem instalados com diferentes seqüências em cada lado da mandíbula dos diferentes animais (tabela 2; p.68). Ao todo 48 implantes foram utilizados neste experimento, sendo doze implantes de cada grupo de estudo. Por fim, os retalhos foram reposicionados e suturados com fio não-absorvível e, portanto, a cicatrização dos implantes aconteceu de forma submersa. Os animais foram mantidos com dieta leve e pastosa por pelo menos 14 dias, quando as suturas foram removidas. A cicatrização das regiões operadas foi acompanhada periodicamente e os dentes remanescentes receberam controle de placa, inclusive com a utilização de pontas ultra-sônicas, mensalmente.

Durante o período de cicatrização de 2 meses, foram administrados marcadores ósseos fluorescentes de acordo com a técnica descrita por Cho et al¹³ a fim de observar o grau e a extensão da formação óssea. No terceiro dia após a colocação dos implantes foi aplicado calceína verde, 20mg/kg peso corpóreo, intravenoso (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); ao completar uma semana foi aplicado alizarina vermelha S, 20mg/kg peso corpóreo, intravenoso (Sigma); na segunda semana foi aplicado oxitetraciclina HCl, 20mg/kg peso corpóreo, intravenoso (Sigma); na quarta semana foi aplicado calceína verde, 20mg/kg peso corpóreo, intravenoso (Sigma) e finalmente na sexta semana foi aplicado calceína azul, 20mg/kg peso corpóreo, intravenoso (Sigma). Todos os corantes foram preparados imediatamente antes do uso com bicarbonato de sódio a 2% ou com solução salina fisiológica. Após o preparo das soluções, o pH foi ajustado a 7,4 e as mesmas foram filtradas com discos de 0,45µm (Schleider & Schuell GmbH, Dassel, Germany). Cada animal recebeu doses de 3 mL de volume de cada corante.

Sacrifício e Processamento Histológico

Oito semanas após a colocação dos implantes, os animais foram sedados e sacrificados com “overdose” de tiopental. As hemi-mandíbulas foram dissecadas, removidas, reduzidas e fixadas em formalina a 4% em pH 7 por dez dias. Os espécimes foram transferidos para uma solução de 70% de etanol e, então, desidratados em concentrações ascendentes de etanol até atingir a concentração de 100%. Em seguida, foram infiltrados e incluídos em resina LR White (London Resin Company, Berkshire, England). Os blocos foram seccionados pela técnica de secção de tecidos duros descrita por Donath &

Breuner¹⁴ de forma a obter lâminas de aproximadamente 50 µm para análise de microscopia de fluorescência¹².

Análise de Fluorescência

Imagens microscópicas de fluorescência foram capturadas no sentido longitudinal da cada implante através de uma câmera de vídeo Leica DC 300F (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany) acoplada a um microscópio Leica MZFL III (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany) utilizando combinações apropriadas de excitação e filtros. Assim para oxitetraciclina HCl foi utilizado o filtro D com nível de excitação entre 325-425nm e para calceína azul foi utilizado o filtro A com nível de excitação entre 340-380nm. Considerando o fato de que a calceína verde foi aplicada em dois tempos distintos (no terceiro dia e na quarta semana após a instalação dos implantes), imagens foram obtidas através de microscópio confocal, o qual obtém imagens sucessivas de diferentes planos da mesma amostra, podendo construir inclusive imagens tridimensionais. Como a alizarina vermelha S foi administrada entre as aplicações da calceína verde, foi possível distinguir as marcações ósseas realizadas por esta última nos diferentes períodos nas imagens geradas pelo microscópio confocal. Todas as imagens foram ajustadas e analisadas através do programa Image J (Image J1.32j, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) com o intuito de quantificar o osso marcado por cada fluorocromo, ou seja, em cada respectivo tempo representativo.

Foram quantificadas as porcentagens de osso marcado nas áreas delimitadas por dois retângulos, um deles ocupando a área total da endentação em si (E) e outro retângulo idêntico posicionado lateralmente, compondo uma

imagem em espelho do primeiro, em uma posição externa à endentação (EE). Estas porcentagens definem a quantidade de osso “fluorescente” (osso marcado) em relação à área total avaliada. Apenas um examinador, que desconhecia a qual grupo pertencia cada uma das imagens, realizou todas as medidas.

Análise Estatística

Os resultados foram estatisticamente submetidos à análise de variância ANOVA para duas variáveis (tratamento de superfície do implante e fluorocromo/tempo). O teste de Tukey foi utilizado para múltiplas comparações a partir das médias. O nível de confiança assumido foi de 95%.

RESULTADOS

Uma intensa remodelação óssea foi demonstrada pela análise de microscopia de fluorescência em todos os grupos estudados. O osso “velho” mostrou-se sempre em tonalidades mais escuras e não fluorescentes (figuras 7 e 8; p. 63 e 64). A alizarina apresentou uma tonalidade vermelha forte, freqüentemente com um aspecto borrado; já a calceína verde apresentou-se, geralmente, através de bandas verdes bastante evidentes; a oxitetraciclina apresentou-se com linhas finas amarelo-esverdeadas e, finalmente, a calceína azul foi caracterizada por uma tonalidade azul, quase sempre com bordas indefinidas (figuras 7 e 8; p. 63 e 64). Em muitos espécimes os osteons secundários foram flagrados através de linhas de marcação fluorescente em arranjo circular concêntrico.

A formação de novo osso foi avaliada histomorfometricamente pela quantificação da presença das marcações fluorescentes. Tais marcações sequencialmente representam o padrão cicatricial de cada grupo de superfície de implante avaliado. As porcentagens de novo osso formado no interior da endentação (E), área adjacente à interface do implante, estão representadas na figura 9 (p.65). Da mesma forma, as porcentagens de novo osso formado na área externa à endentação (EE), ou seja, distante da interface do implante, estão representadas na figura 10 (p.66).

A comparação entre os grupos considerando o osso marcado na região E demonstrou uma diferença estatisticamente significativa em favor do grupo A apenas no período de 4 semanas ($p < 0,001$). No entanto, nos períodos de 3 dias e de 6 semanas o grupo A alcançou valores numericamente superiores de incorporação dos fluorocromos em relação aos demais grupos.

Quanto à avaliação da área EE os resultados foram bastante similares em todos os grupos ao longo de todos os períodos de aplicação de fluorocromos. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p>0.05$).

Finalmente, na análise intra-grupos, que representa o efeito das diferentes superfícies de implantes entre as regiões E (adjacente a superfície do implante) e EE (distante à superfície do implante) também não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos grupos.

DISCUSSÃO

O uso de marcadores ósseos é essencial para a análise de microscopia confocal e de fluorescência. Suas aplicações em diferentes períodos permitem a avaliação da formação e remodelação ósseas durante diferentes estágios da cicatrização. A alizarina vermelha, a calceína verde, a oxitetraciclina e a calceína azul são fluorocromos de diferentes expressões colorimétricas e, portanto, podem prover informações sequenciais quando aplicados intercaladamente. Estes marcadores ósseos, usados no presente estudo, podem ser comparados porque se unem aos íons cálcio por quelação¹⁵, o que lhes permite evidenciar apropriadamente áreas ativas de mineralização¹².

De uma forma geral, a incorporação dos fluorocromos obedeceu a um mesmo padrão nos diferentes grupos de superfície de implantes no presente estudo, ao longo do período de avaliação compreendido entre 3 dias e 6 semanas. Até a primeira semana, a porcentagem de osso marcado permaneceu entre 10 e 13% em todos os grupos. Entretanto, na avaliação de 2 semanas um aumento significativo da formação óssea foi detectado nos quatro grupos. Todos eles alcançaram seus valores mais altos de osso marcado, o que representa, individualmente, seus picos de mineralização. Na avaliação de 4 semanas, o nível de osso marcado decresceu consideravelmente em todos os grupos, exceto no grupo A no qual a queda se deu de forma significativamente mais branda. Em outras palavras, os grupos B, C e D apresentaram suas menores marcas neste período, ao redor de 6%, enquanto que o grupo A apresentou 13% de osso marcado neste mesmo período. Finalmente, no período de 6 semanas, outro aumento na atividade de

mineralização ocorreu para todos os grupos (B=16%, C=18%, D=12%) e, especialmente, para o grupo A (21%).

Avaliações como estas, sobre os eventos iniciais da formação óssea ao redor de implantes ainda são escassas. Frequentemente os estudos envolvendo diferentes tipos de superfícies de implantes analisam a osseointegração em si, com base nos índices de contato osso-implante obtidos ao final do tempo experimental, por exemplo. Os estudos de microscopia de fluorescência, entretanto, investigam possíveis diferenças no padrão de formação óssea durante o processo de remodelação óssea, levando em consideração quatro ou cinco tempos de avaliação distintos. De outra forma, Abrahamsson et al¹⁶ avaliaram histologicamente e morfometricamente o processo da cicatrização óssea entre 2 horas e 12 semanas a partir da instalação dos implantes em cães. Os animais foram sacrificados e biópsias foram obtidas em tempos sequenciais. Das secções não-descalcificadas foram estabelecidas as proporções de osso imaturo, osso lamelar, estruturas não mineralizadas (tecido residual) e restos ósseos; e das secções descalcificadas foram enumerados os osteoblastos, as células mesenquimais tipo fibroblastos e os componentes de tecido mineralizado, entre outros.

Confrontando os resultados sobre a remodelação óssea ao redor de implantes obtidos em cada tempo específico do presente estudo com aqueles descritos por Abrahamsson et al¹⁶, no estudo mencionado acima, pode-se obter informações complementares e, portanto, mais interessantes. Assim observou-se que durante a primeira semana, imediatamente após a instalação dos implantes (períodos de avaliação de 3 e de 7 dias), índices significativos de atividade de mineralização já podiam ser flagrados nas áreas investigadas. Os

valores percentuais de osso marcado variaram entre 10 e 13%, de uma forma geral, em todos os grupos. De acordo com Abrahamsson et al¹⁶, nos momentos mais iniciais espera-se encontrar um coágulo, o qual é rapidamente penetrado por estruturas vasculares e circundado perifericamente por células mesenquimais do tipo fibroblasto (tecido granulomatoso ou de granulação imaturo). Este conjunto não é capaz de prover uma matriz mineralizada substancial. No entanto, no período de uma semana, com o início da formação do osso imaturo, a pré-formação dos centros ósseos já pode ser reconhecida¹⁶ e, assim, um aumento dos componentes mineralizados pode ser notado ainda que seja majoritária a matriz provisória de tecido conjuntivo rica em estruturas vasculares. Após 2 semanas presume-se a existência de um trabeculado de novo osso a ocupar todo o espaço físico disponível. Neste momento um processo ativo de mineralização é caracterizado¹⁶. Estas observações suportam os resultados encontrados no presente estudo que mostraram o pico de mineralização para todas as superfícies estudadas no período de 2 semanas. Em sequência a este processo ininterrupto, com 4 semanas observou-se uma queda nos níveis de mineralização neste estudo, que pode ser explicada pelo fato de que grande parte da área ocupada pelo osso imaturo já havia sido substituída por osso lamelar neste momento, como evidenciado por Abrahamsson et al¹⁶. Nas 4 semanas subsequentes é prevista, finalmente, a formação dos osteons secundários determinando a remodelação óssea. As fases de formação e reabsorção ósseas são sistematicamente intercaladas e o índice de mineralização tende a crescer de forma desacelerada, porém gradual como observada nos achados referentes ao período de 6 semanas do presente estudo.

A remodelação óssea prevê uma substituição do tecido ósseo, podendo melhorar sua qualidade tanto em relação às propriedades mecânicas quanto às propriedades metabólicas¹⁷. A remodelação envolve o recrutamento de osteoclastos que formam cavidades na superfície trabecular. Ao final desta fase de reabsorção, os osteoclastos se mudam ou desaparecem, e após uma breve interrupção (fase reversa), os osteoblastos começam a depositar nova matriz óssea (fase de formação óssea)¹⁷. Este fenômeno pareado detém especial interesse por envolver células de origens diferentes em ambas unidades de remodelação, cortical e trabecular. O início destas atividades pareadas envolve obviamente uma ação concertada de múltiplos fatores como: ativação dos osteoclastos, proliferação e diferenciação dos osteoblastos, formação da matriz e mineralização. Portanto, o índice mais alto de osso marcado encontrado no período de quatro semanas no grupo A pode ser entendido como um balanço positivo para formação óssea. É desconhecida a forma como a superfície de implante biofuncionalizada com “baixa concentração” de peptídeo bioativo possa ter influenciado positivamente a formação óssea neste período específico, ocasionando um índice de mineralização significativamente superior para o grupo A. Considerando a mineralização em si, alguns requisitos básicos são considerados compulsórios, como a adequada concentração de íons cálcio e fosfato, a presença de uma matriz capaz de sofrer calcificação, agentes nucleadores e ainda um controle por agentes reguladores (promotores e inibidores)¹⁸.

O tecido ósseo pode ser classificado com base na orientação das fibras colágenas. Assim, enquanto no osso imaturo as fibras colágenas encontram-se orientadas de uma maneira aleatória, o osso lamelar é caracterizado por

camadas de fibras distribuídas paralelamente. Na análise de fluorescência o osso imaturo apresenta-se com um aspecto borrado e não claramente delineado, enquanto que o osso lamelar se mostra em bandas fluorescentes bem definidas, isto porque a marcação por fluorescência é restrita aos pontos de ativa mineralização¹⁷. Tais aspectos descritos para o osso imaturo e para o osso lamelar foram confirmados no presente estudo. O osso imaturo foi marcado pela alizarina vermelha que foi administrada uma semana após a instalação dos implantes e foi observado em formas difusas. Já o osso lamelar foi representado principalmente pela oxitetraciclina administrada duas semanas após a instalação dos implantes e pela calceína verde administrada quatro semanas após a instalação dos implantes. As imagens de ambos os períodos revelam um aspecto bem diferenciado, determinado por bandas fluorescentes bem definidas e melhor organizadas. Estes achados estão de acordo com o processo de formação óssea observado por Schenk et al¹⁹ em defeitos ósseos, que presume inicialmente o estabelecimento do osso imaturo o qual é seguido pela estruturação do osso lamelar. O osso imaturo se forma mais rapidamente, e o intervalo entre a deposição da matriz osteóide e a mineralização é pequeno. Contrariamente, a formação do osso lamelar acontece mais lentamente e a mineralização se dá de forma mais organizada respeitando as camadas lamelares paralelas e/ou concêntricas.

CONCLUSÃO

Segundo a análise de microscopia de fluorescência, todas as superfícies de implante avaliadas, daquela composta apenas da topografia microtexturizada às bioativas, apresentaram um padrão de formação e remodelação óssea, no âmbito geral, similar.

No entanto, os valores numéricos percentuais superiores obtidos pela superfície de implante contendo o peptídeo bioativo em “baixa concentração” durante o período avaliado, sugerem que a funcionalização pode ser uma modificação da estrutura superficial positiva no processo de osseointegração e que diferentes concentrações peptídicas podem conduzir a resultados também diferentes.

AGRADECIMENTO

Este estudo foi parcialmente financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processos 05/60839-8 e 06/56020-6) e pela DENTSPLY Friadent.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. J Biomed Mater Res. 2000; **49**:155-166.
2. MacDonald DE, Markovic B, Allen M, Somasundaran P, Boskey AL. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. J Biomed Mater Res. 1998; **41**: 120-130.
3. Rezanian A, Healy KE. Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells. Biotechnol Prog. 1999; **15**: 19-32.
4. Rezanian A, Thomas CH, Branger AB, Waters CM, Healy KE. The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein. J Biomed Res. 1997; **37**: 9-19.
5. Goldberg V, Stevenson S, Feighan J, Davy D. Biology of grit-blasted titanium alloy implants. Clin Orthop Relat Res. 1995; **319**:122-129.
6. Bagno A, Piovan A, Dettin M, et al. Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides. Bone. 2007; **40**: 693-699.
7. Schuler M, Owen GR, Hamilton DW, et al. Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. Biomaterials. 2006; **27**: 4003-4015.

8. Park JM, Koak JY, Jang JH, Han CH, Kim SK, Heo SJ. Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006; **21**: 859-866.
9. Becker J, Kirsch A, Schwarz F, et al. Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs. *Clin Oral Investig*. 2006; **10**: 217-224.
10. Germanier Y, Tosatti S, Brogгинi N, Textor M, Buser D. Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces. A histomorphometric study in miniature pigs. *Clin Oral Impl Res*. 2006; **17**: 251-257.
11. Suzuki K, Aoki K, Ohya K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone*. 1997; **21**: 507-514.
12. Nkenke E, Kloss F, Wiltfang J, et al. Histomorphometric and fluorescence microscopic analysis of bone remodelling after installation of implants using an osteotome technique *Clin Oral Impl Res*. 2002; **13**: 595–602.
13. Cho K-S, Choi S-H, Chai J-K, Wikesjö UME, Kim C-K. Alveolar bone formation at dental implant dehiscence defects following guided bone regeneration and xenogenic freeze-dried demineralized bone matrix. *Clin Oral Impl Res*. 1998; **9**: 419-428.

14. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982; **11**: 318-326.
15. Sun TC, Mori S, Roper J, Brown C, Hooser T, Burr DB. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information? *Bone.* 1992; **13**: 443-446.
16. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Impl Res.* 2004; **15**: 381–392.
17. Schenk RK. Bone regeneration: biologic basis. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK, eds. *Guided bone regeneration in implant dentistry.* St Louis: Quintessence Publishing Co, 1994: 49-100.
18. Kahn AJ, Fallon MD, Teitelbaum SL. Structure-function relationships in bone: An examination of events at the cellular level. In: Peck WA, ed. *Bone and mineral research.* Amsterdam: Elsevier; 1983: 125-174.
19. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994; **9**: 13-29.

FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1: Implante de 4,5 mm de largura por 9,5 mm de comprimento. Observe a endentação (seta) realizada a 2,3 mm do topo do implante, com 0,18 mm de profundidade e 1,5 mm de comprimento, na qual foram aplicados os diferentes tratamentos de superfície.

Figura 2: Imagens de microscopia eletrônica de varredura

A) superfície microtexturizada (aumento de 1.000X); **B)** superfície microtexturizada (aumento de 10.000X); **C)** superfície microtexturizada após a adsorção do veículo de hidroxiapatita (aumento de 1.000X); **D)** superfície microtexturizada após a adsorção do veículo de hidroxiapatita associado ao peptídeo bioativo (aumento de 10.000X).

Figura 3

A) Rebordo completamente cicatrizado, três meses após as exodontias; **B)** retalho mucoreroiosteal entre canino e primeiro molar mandibulares; **C,D e E)** perfurações e instalação dos implantes em cada hemi-arco; **F)** Reposicionamento dos retalhos e suturas simples, caracterizando uma cicatrização submersa.

Figura 4

Análise histomorfométrica: Imagens histológicas representando os quatro grupos experimentais (coloração: *Stevenel's blue* e *Alizarin red S*). Ao lado direito de cada imagem representativa, notem o contato entre osso e superfície do implante (em preto) na parte superior da endentação. Observe a quantidade e tamanho dos espaços medulares presentes nos diferentes espécimes.

** descrição de cada grupo experimental na página 67

Figura 5:

Resultados obtidos nos diferentes grupos experimentais (A,B,C e D) quanto a contato osso-implante (COI), densidade óssea adjacente (DOA) e densidade óssea distante (DOD).

** descrição de cada grupo experimental na página 67

Figura 6:

Histogramas representando o percentual de densidade óssea obtida ao redor de cada implante nos diferentes grupos experimentais

** descrição de cada grupo experimental na página 67

Figura 7:

Análise de Microscopia de Fluorescência: A nova formação óssea foi determinada histomorfometricamente pela quantificação dos marcadores ósseos fluorescentes dentro e fora das edentações. O osso velho apresentou-se em tons escuros, sem fluorescência. **A)** Alizarina vermelha com uma coloração desta mesma cor, fluorescente, porém com bordas não definidas; **B)** Oxitetraciclina mostrando linhas finas amarelo-esverdeadas; **C)** Calceína verde com fortes e evidentes linhas verdes; e **D)** Calceína azul, definida por linhas suaves e difusas, de cor azul-claro.

Figura 8:

Análise de Microscopia de Fluorescência

A) Alizarina vermelha; **B)** Alizarina vermelha e calceína verde fluorescendo no mesmo canal utilizando a microscopia confocal; **C)** Calceína verde.

Figura 9:

Análise de Fluorescência / Confocal

Medidas adjacentes aos implantes

Figura 10:

Análise de Fluorescência / Confocal

Medidas distantes aos implantes

TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais definidos pelas quatro diferentes superfícies de implante

Grupo	Características da superfície
A	microtexturizada + cobertura de HA
	+ peptídeo bioativo
	em baixa concentração
B	microtexturizada + cobertura de HA
C	microtexturizada
	(jateamento associado a ataque ácido)
D	microtexturizada + cobertura de HA
	+ peptídeo bioativo
	em alta concentração

Tabela 2: Aleatorização dos sítios experimentais esquerdos e direitos de cada animal (total da amostra: 8 cães) em relação aos grupos de estudos de diferentes superfícies (A, B, C e D)

	E 1	E 2	E 3	D 1	D 2	D 3
1	A	B	C	D	A	B
2	C	D	A	B	C	D
3	B	C	D	A	B	C
4	D	A	B	C	D	A
5	D	A	B	A	B	C
6	B	C	D	C	D	A
7	A	B	C	B	C	D
8	C	D	A	D	A	B

Tabela 3: Resultados dos parâmetros histomorfométricos avaliados nos quatro grupos experimentais: contato osso-implante (COI), densidade óssea adjacente (DOA) e densidade óssea distante (DOD)

Grupo	n*		média**	DP**	mínimo	Máximo
A	12	COI	60,41	17,56	28,10	90,50
		DOA	54,67	16,63	30,80	78,90
		DOD	47,07	16,84	15,20	68,90
B	12	COI	62,43	17,44	28,90	96,20
		DOA	46,02	21,04	16,10	87,70
		DOD	44,99	17,53	16,50	87,00
C	12	COI	58,00	11,85	38,70	72,50
		DOA	45,30	11,35	28,40	62,40
		DOD	44,66	14,64	21,80	75,60
D	12	COI	65,41	17,17	20,80	88,50
		DOA	40,71	15,37	17,40	64,00
		DOD	41,42	18,78	12,70	68,40

* n = número de implantes em cada grupo

** valores percentuais de média e desvio padrão (DP)

Tabela 4: Comparação múltipla entre os grupos experimentais

comparação	<i>p</i> valor		
	COI	DOA	DOD
A versus B	0,983	0,650	0,990
A versus C	0,989	0,598	0,986
A versus D	0,903	0,252	0,855
B versus C	0,907	0,999	1,000
B versus D	0,988	0,885	0,958
C versus D	0,757	0,525	0,967

COI: contato osso-implante

DOA: densidade óssea adjacente

DOD: densidade óssea distante

ARTIGO 1 EM INGLÊS

Autores: R.R.M. Barros et al.

Short Title: Biofunctionalized implant surface effect

The Effect of a Biofunctionalized Implant Surface on the Osseointegration. A Histomorphometric Study in Dogs

Raquel R. M. BARROS

Arthur B. NOVAES Jr.

Vula PAPALEXIOU

Sérgio L. S. SOUZA

Mário TABA Jr.

Daniela B. PALIOTO

Márcio F. M. GRISI

Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology,
School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP,
Brazil

Correspondence: Dr. Arthur B. Novaes Jr., Departamento de Cirurgia e T.B.M.F. e Periodontia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Avenida do Café, S/N, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brasil. Tel: +55-16- 3602-3979. Fax: +55-16-3602-4788. e-mail: novaesjr@forp.usp.br

SUMMARY

Among the different surface properties that influence the bone apposition around implants, the chemical or biochemical composition may interfere in its acceptance by the surrounding bone. The aim of this study was to investigate if a biofunctionalization of implant surface influences the bone apposition in a dog model and to compare it with other surfaces, such as a microstructured created by the grit-blasting/acid-etching process. The mandibular bilateral premolars of 8 dogs were extracted and after 12 weeks each dog received 6 implants, totaling 48 implants in the experiment. All the 4 experimental groups had the same microrough topography with or without some biofunctionalization treatment. After histomorphometric analysis it was observed that the modified microstructured surface with a “low concentration of the bioactive peptide” provided a higher adjacent bone density (54.6%) when compared to the other groups (microstructured + HA coating = 46.0%, microstructured only = 45.3% and microstructured + “high concentration of the bioactive peptide” = 40.7%), but this difference was only numeric and not statistically significant. In conclusion the biofunctionalization of the implant surface could interfere in the bone apposition around implants in particular in terms of bone density and different concentrations of bioactive peptide lead to different results.

Key Words: bioactive peptide, dental implants, histomorphometric analysis, animal study.

INTRODUCTION

Knowledge regarding endosseous dental implants has rapidly expanded over the last years, making them a viable treatment alternative to replace missing teeth in many different situations with predictable high rates of clinical success (1). Great part of this approach could be explained by the development of implant surfaces that improved implant anchorage with enhanced bone apposition (2,3).

As a critical factor for osseointegration the nature of the implant surface remains under investigation. Among the different surface properties that influence the bone apposition around titanium implants, the topography has been extensively explored. It was recognized that microstructured surfaces provide higher success rate when compared to smooth or machined surfaces. Increased cell migration and proliferation (4) as well as enhanced bone apposition (5) and bone-to-implant contact (6) are some findings of in vitro and in vivo studies that support the superiority of the microstructured surfaces. Additionally, other studies (7) have shown that implants with this kind of rough surfaces require a greater torque for removal when compared to smooth surfaces; and also that implant roughness is important when immediate loading is to be applied (8).

Bone is a complex composite in which a very large mineral component occurs in close association with collagen. Collagen comprises >90% of the spatially fixed matrix of bone and is the major regulator of cell adhesion (9) and osteogenic differentiation (10), serving as conduit for a variety of biochemical and biomechanical signals between cells. Recently some researchers are focusing on the mechanisms of interaction between proteins from the extra cellular matrix (ECM) and cell membrane receptors (11,12). Several of these biomolecules (native proteins and synthetic peptides) are known to

control cell adhesion and growth. The most investigated mechanism for osteoblast adhesion implies the interaction with RGD sequences via cell-membrane integrin receptors (13). Thus, the RGD sequence has been extensively used as candidate peptide to enhance cell adhesion onto biomaterial surfaces (14).

Generally the bone-to-implant interaction is complex, and does not depend on surface topography only. Chemical or biochemical composition of implant surface also plays a crucial role in the early stages of bone formation (15,16). Cell recruitment onto biomaterial surface is a fundamental step within the multifaceted process responsible for implant osseointegration; this process involves several proteins from the extra cellular matrix (ECM), cytoskeleton and cell membrane (17). Thus, it could be suggested that the biofunctionalization of implant surfaces, associating on them adhesive factors to cells, may interfere in the acceptance and bonding of the implant to the surrounding bone. Biofunctionalized surfaces that mimic the tissue environment in bone may be expected to enhance the performance of dental implants, encouraging the initial biologic response (17).

The purpose of this histomorphometric study was to investigate if an implant surface containing a low or high concentration of a bioactive peptide influences the bone-implant contact and density around implants and also to compare it with other implant surfaces including a microstructured surface created by the grit-blasting/acid-etching process.

MATERIAL AND METHODS

Implant Design and Manufacturing

All implants were manufactured from commercially pure titanium following the XiVE design (Dentsply Friadent, Mannheim, Germany) and measured 4.5mm X 9.5mm. The

implants were characterized by an indentation placed 2.3mm from the top of the implant with a depth of 0.18mm and a height of 1.5 mm (Figure 1: implant design). In this indentation four different coatings were performed constituting the four different implant groups A, B, C and D. Firstly, the indentations of all four groups were lined by the microstructured FRIADENT plus surface (DENTSPLY Friadent) provided by the grit-blasting/acid-etching process. For biofunctionalization of the implant surface a bioactive peptide was absorbed to nano-crystalline HA coatings and diluted in PBS solution. The bioactive peptide could also be described as a sequence of aminoacids related to bone formation; however the detailed composition has not been disclosed by the manufacturer (proprietary processing). Thus, group A was constituted by the FRIADENT plus surface morphology coated with nano-crystalline HA coating and a “low concentration” (20 µg/mL) of the bioactive peptide, while group D had the same characteristics but a “high concentration” (200 µg/mL) of the bioactive peptide. In group B, the implants were lined by the FRIADENT plus surface in conjunction with the nano-crystalline HA coating alone and in group C, was prepared only with the FRIADENT plus surface. It is important to emphasize that the FRIADENT plus surface morphology was not changed due to the surfaces’ biofunctionalization process. The FRIADENT plus surface morphology was fully maintained following the application of a thin HA + bioactive peptide coating as seen in the SEM images (Figure 2).

The study was blinded, thus all the professionals involved from the surgeon to the examiner of the histologic specimens had no knowledge of the constitution of the groups. The different coatings that characterized the four different implant surfaces were only revealed when the histomorphometric analysis was finished.

Surgical Procedure

The study protocol was approved by the Institution's Animal Research Committee and involved two surgical interventions that were performed in eight young adult male mongrel dogs, weighing approximately 12 kg. The animals presented intact maxillas, no general occlusal trauma, and no oral viral or fungal lesions and were in good general health, with no systemic involvement as determined by a veterinarian following clinical examination.

In the first surgery, after sedation the dogs were anesthetized with thiopental *iv* (1 ml/kg; 20 mg/kg thiopental diluted in 50 ml saline). Subsequently, full-thickness flaps were bilaterally elevated in the area of the first to fourth mandibular premolars. The teeth were sectioned in a buccolingual direction at the bifurcation so that the roots could be individually extracted, without damaging the bony walls, using a periosteal elevator. The flaps were repositioned and sutured with non-absorbable 4-0 sutures.

After a healing period of three months, the animals received 20,000 IU penicillin and streptomycin (1.0 g/10 kg) the night before the second surgeries. This dose provides antibiotic coverage for 4 days, thus another dose was given 4 days later to provide coverage for a total of 8 days. After repeating the same sedation and anesthesia used in the first surgeries, horizontal crestal incisions were bilaterally performed from the distal region of the canine to the mesial region of the first molar. Three implants were randomly inserted in each side of the mandible of each animal. Thus the locations and sides of the mandibles of the animals were treated with different sequences of implant groups. A total of 48 implants were disposed in the experiment, twelve for each group (A, B, C or D). The flaps were sutured with non-absorbable sutures and the implants were left to heal in a submerged position. The animals were maintained on a soft diet

for 14 days when the sutures were removed. The healing was evaluated periodically and the remained teeth were cleaned monthly with ultrasonic points.

Sacrifice and Histological Processing

The animals were sedated and then sacrificed with an overdose of thiopental eight weeks after implant placement. The hemi-mandibles were removed, dissected and fixed in 4% phosphate-buffered formalin pH 7, for 10 days, and transferred to a solution of 70% ethanol until processing. The specimens were dehydrated in increasing concentrations of alcohol up to 100%, infiltrated and embedded in LR White resin (London Resin Company, Berkshire, England), and then hard-sectioned (18). The sections were prepared for histomorphometry and stained with *Stevenel's blue* and *Alizarin red S* for optic microscopic analysis.

Histomorphometric analysis

Longitudinal histological sections from each implant were captured through a video camera Leica DC 300F (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany) joined to a stereomicroscope Leica MZFL III (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany). The images were analyzed through the Image J program (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), to determine the percentages of bone-to-implant contact (BIC) and bone density within the indentations.

Through linear measurements the percentages of mineralized bone in direct contact with the implant surface (BIC) were determined within the indentations (19).

The bone density was determined within two rectangles, one of them inside the indentation (BDA), occupying its total area, and the other outside the indentation (BDD) as mirror image of the first. The bone density measurements evaluated the

percentages of mineralized bone in relation to the percentages of marrow cavities. A single examiner, with no knowledge if the sections were from groups A, B, C or D made the measurements.

Statistical Analysis

The values of bone-implant contact and bone density were statistically analyzed using a mixed linear model for multiple variables and a standard two-sample t-Test for a single variable. In the mixed linear model with the software SAS/STAT (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) a compound-symmetry covariance structure between the data was assumed to perform two repeated- measurements (side, surface). Repeated measurements within the same animal were done using a Tukey-adjusted multiple mean value comparison. The independent two sample t-Test was applied between all mean values within different surface modifications using the software SPSS (SPSS GmbH Software, Germany).

RESULTS

After the implant placement, healing progressed uneventfully during the 8-week postoperative period without significant signs of inflammation. The radiographic evaluation of the implants immediately before the sacrifice revealed normal conditions of bone, thus the total sample of 48 implants were analyzed histomorfometrically, being 12 from each experimental group.

Histologic Observations

The bone-implant interface had mineralized bone matrix in intimate contact with the implant surface in the four groups.

The bone tissue was characterized by concentric or parallel lamellar formations. Central canals seen were of different diameters, covered by endosteum, and that were in close contact with the implant surface at some points (Figure 3).

Histomorphometric Findings

The implant surface characterization of each experimental group A, B, C or D was previously described.

The histomorphometric results of the percentages of direct BIC within the implant indentations, shown in table 1, revealed that the highest mean value of $65.4 \pm 17.1\%$ for group D (ranging from 20.8 to 88.5%). In sequence, group B had a BIC mean of $62.4 \pm 17.4\%$ (ranging from 28.9 to 96.2%), group A $60.4 \pm 17.5\%$ (ranging from 28.1 to 90.5%) and, finally, group C that showed a numerically inferior BIC mean of $58.0 \pm 11.8\%$ (ranging from 38.7 to 72.5%) when compared to the other groups. No statistically significant differences were detected between the groups ($p > 0.05$).

Bone density analysis revealed that the percentage of bone in adjacent areas for group A was $54.6 \pm 16.6\%$ (ranging from 30.8 to 78.9%); for group B it was $46.0 \pm 21.0\%$ (ranging from 16.1 to 87.7%); for group C $45.3 \pm 11.3\%$ (ranging from 28.4 to 62.4%) and for group D $40.7 \pm 15.3\%$ (ranging from 17.4 to 64.0%) (Table 1). However, the differences between the groups were not statistically significant ($p > 0.05$). The average of bone densities in areas distant from the implants was $47.0 \pm 16.8\%$ (ranging from 15.2 to 68.9%) for group A, $44.9 \pm 17.5\%$ (ranging from 16.5 to 87.0%) for group B, $44.6 \pm 14.6\%$ (ranging from 21.8 to 75.6%) for group C and $41.4 \pm 18.7\%$

(ranging from 12.7 to 68.4%) for group D (Table 1) and again the results were not statistically significant ($p>0.05$).

DISCUSSION

A new strategy to improve endosseous implant integration is based on preparing biofunctionalized surfaces with the inclusion of cell adhesive factors for example.

Cell adhesion is a fundamental process directly involved in cell growth, cell migration, and cell differentiation. It is concerned in embryogenesis, maintenance of tissue integrity, wound healing, immune response, and biomaterial tissue integration. Several proteins are involved in cell adhesion, such as extracellular matrix proteins (collagen, fibronectin, vitronectin) and membrane receptors (integrins). Interactions between these proteins and their specific receptors induce signal transduction and consequently influence cell growth and differentiation (11).

The development of bone–implant interfaces depends on the direct interactions of bone matrix and osteoblasts with the biomaterial. Osteoblast adhesion is therefore essential for bone–biomaterial interactions (11).

It has been shown in vitro that a functionalized titanium substrate with synthetic peptides may enhance the adhesion of human osteoblast-like cells (17). The presence of synthetic peptides also demonstrates an increase in the osteogenic gene expression for alkaline phosphatase and for BMP-2 and BMP-7. These BMPs have been reported to stimulate osteoblastic activity through autocrine and paracrine mechanisms (20).

In the current study a biofunctionalized implant surface with different concentrations of a bioactive peptide was tested in an animal model, providing histomorfometric analysis of the bone density and bone-implant contact. The modified FRIADENT plus-surface with a low concentration of the bioactive peptide (group A implants) provided a higher adjacent bone density (54.6%) when compared with the

other group surfaces (group B = 46.0%, group C = 45.3% and group D = 40.7%). The difference was only numeric and not statistically significant and it may be in part due to the sample size. The average of bone density in areas distant from the implants was also higher in the group A, but not as evident as the other parameter. According to the histograms (Figure 4) that show the dispersion of the bone density values for all implant surface groups, the group A achieved a better performance when compared with the other groups. In that group seven implants from 12 showed 40-60% of BDA, three implants achieved more than 70% of BDA and no implants had less than 30% of BDA. The presence of a high concentration of the bioactive peptide did not provide any advantages considering the group A bone density results. Although six implants from the 12 showed 40-60% of BDA in the group D, no implants achieved more than 70% of BDA and three implants had less than 30% of BDA. Thus it could be concluded that the concentration of the bioactive peptide interferes in the bone apposition process and that the low concentration was better than the high concentration. The histogram analysis also shows that the group C exhibited inferior results when compared with group A. In this group C, which represents the grit-blasted/acid-etched implant surface (FRIADENT plus surface), six implants from the 12 showed 40-60% of BDA, but no implants achieved more than 70% of BDA and two implants had less than 30% of BDA. Finally, in group B, composed by the FRIADENT plus surface in conjunction with the nano-crystalline HA coating alone, five implants from 12 showed 40-60% of BDA, two implants achieved more than 70% of BDA and three implants had less than 30% of BDA. These results indicate that the biofunctionalization could positively interfere in the bone apposition process. Germanier et al (15) recently stated that the topography is not the only surface characteristic capable of enhancing new bone apposition, as observed in an in vivo study. Besides Schuler et al (16) showed in an in vitro study that

surface chemistry also influenced the attachment and morphology of cells. In general, an increase in cell number and more spread cells were observed on bioactive substrate (containing RGD) compared to bio-inactive surfaces according to their findings. In the present study it is not possible to describe exactly how the low bioactive peptide concentration coating acts during bone healing; one hypothesis is that the improvement of the surface biochemical composition was able to enhance its ability to interact with cells by mechanisms that simulate the interaction of cells with their extracellular matrices.

Interestingly the low concentration modified FRIADENT plus surface did not show higher BIC average when compared with the other surfaces. Instead, statistically similar average values were observed for the four groups (group A=60.4%, B=62.4%, group C=58.0% and group D=65.4%). According to the results it could be speculated that the establishment of the bone-to-implant contact was influenced mainly by the underlying pore structure of the FRIADENT plus surface, which was not altered by the biofunctionalization. However, further investigations are required.

The biofunctionalization of implant surfaces is still a poorly investigated area. The enhancement of bone density around the modified-FRIADENT plus surface (low concentration of bioactive peptide) is promising. Further in vitro and in vivo studies are necessary to elucidate how and in which extent the biofunctionalization of the implant surfaces could represent an advantageous modification.

CONCLUSION

It could be concluded that a biofunctionalization of the implant surface interferes in the bone apposition process around implants in particular in terms of bone density and that different concentrations of bioactive peptide lead to different results.

RESUMO

Entre as diferentes propriedades de uma superfície capazes de influenciar a deposição óssea ao redor de implantes, a composição química e bioquímica pode atuar no reconhecimento do tecido ósseo circundante. O presente trabalho investigou a influência da biofuncionalização de superfícies de implante na deposição óssea ao redor dos mesmos em um modelo animal, comparando-as com outras superfícies, como a microtexturizada obtida pelo processo de jateamento e ataque ácido. Metodologicamente, os pré-molares mandibulares bilaterais de 8 cães foram extraídos e após 12 semanas foram instalados 6 implantes em cada cão, constituindo uma amostra de 48 implantes. Dos quatro grupos experimentais de diferentes superfícies, todos continham a mesma microtopografia rugosa, porém possuindo ou não alguma biofuncionalização. A análise histomorfométrica revelou que a superfície microtexturizada modificada pela adição de baixa concentração peptídica obteve uma maior densidade óssea adjacente (54.6%) quando comparada aos outros grupos (microtexturizada + HA = 46%, somente microtexturizada = 45.3% e microtexturizada com adição de alta concentração peptídica = 40.7%), no entanto estas diferenças numéricas não foram estatisticamente significantes. Dentro deste contexto, conclui-se que a biofuncionalização da superfície de implantes pode interferir na aposição óssea, em particular na densidade óssea, e que diferentes concentrações peptídicas podem conduzir a diferentes resultados.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by DENTSPLY Friadent and by FAPESP (process numbers 05/60839-8 and 06/56020-6). We also like to thank to Sebastião Carlos Bianco (Laboratory of the Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo) for assistance in histological processing.

REFERENCES

- (1) Adell R, Lekholm U, Rockler B, Bränemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 1981;10:387-416.
- (2) Cochran DL. A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol* 1999;70:1523-1539.
- (3) Ferguson SJ, Langhoff JD, Voelter K, von Rechenberg B, Scharnweber D, Bierbaum S, Schnabelrauch M, Kautz AR, Frauchiger VM, Mueller TL, van Lenthe GH, Schlottig F. Biomechanical comparison of different surface modifications for dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23:1037-1046.
- (4) Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, Boyan B. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials* 2005;26:1837-1847.
- (5) Bornstein MM, Valderrama P, Jones AA, Wilson TG, Seibl R, Cochran DL. Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant

surfaces: a histomorphometric study in canine mandibles. Clin Oral Implants Res 2008;19:233-241.

(6) Le Guehennec L, Goyenvalle E, Lopez-Heredia MA, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Histomorphometric analysis of the osseointegration of four different implant surfaces in the femoral epiphyses of rabbits. Clin Oral Implants Res 2008;19:1103-1110.

(7) Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implants materials, designs, and surfaces topographies: their effect on osseointegration. A literature review. Int J Oral Maxillofac Implants 2000;15:675-690.

(8) Uribe R, Penarrocha M, Balaguer J, Fulgueiras N. Immediate loading in oral implants. Present situation. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005;10:143-153.

(9) Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. J Cell Biol 1981;88:473-485.

(10) Mizuno M, Kuboki Y. TGF-beta accelerated the osteogenic differentiation of bone marrow cells induced by collagen matrix. Biochem Biophys Res Commun 1995;211:1091-1098.

(11) Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, Hardouin P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. J Biomed Mater Res 2000;49:155-166.

(12) MacDonald DE, Markovic B, Allen M, Somasundaran P, Boskey AL. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. J Biomed Mater Res 1998;41:120-130.

(13) Xiao Y, Truskey GA. Effect of receptor-ligand affinity on the strength of endothelial cell adhesion. Biophys J 1996;71:2869-2884.

- (14) Rezania A, Healy KE Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells. *Biotechnol Prog* 1999;15:19-32.
- (15) Germanier Y, Tosatti S, Broggin N, Textor M, Buser D. Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces. A histomorphometric study in miniature pigs. *Clin Oral Impl Res* 2006;17:251-257.
- (16) Schuler M, Owen GR, Hamilton DW, de Wild M, Textor M, Brunette DM, Tosatti SG. Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. *Biomaterials* 2006;27:4003-4015.
- (17) Bagno A, Piovan A, Dettin M, Chiarion A, Brun P, Gambaretto R, Fontana G, Di Bello C, Palu G, Castagliuolo I. Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides. *Bone* 2007;40:693-699.
- (18) Shibli JA, Grassi S, Piattelli A, Pecora GE, Ferrari DS, Onuma T, d'Avila S, Coelho PG, Barros R, Iezzi G. Histomorphometric Evaluation of Bioceramic Molecular Impregnated and Dual Acid-Etched Implant Surfaces in the Human Posterior Maxilla. *Clin Implant Dent Relat Res* 2009; 23. [Epub ahead of print]
- (19) Novaes Jr AB, Souza SLS, Oliveira PT, Souza AMMS. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:377-383.
- (20) Ripamonti U, Reddi AH. Growth and morphogenetic factors in bone induction: role of osteogenin and related bone morphogenetic proteins in craniofacial and periodontal bone repair. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;3:1-14.

Table1: Effect of implant surface on bone-to-implant contact (BIC), bone density/adjacent (BDA) and bone density/distant (BDD)

Implant surface	n*	Variable	Mean**	SD**	Minimum value	Maximum value
A	12	BIC	60.41	17.56	28.10	90.50
		BDA	54.67	16.63	30.80	78.90
		BDD	47.07	16.84	15.20	68.90
B	12	BIC	62.43	17.44	28.90	96.20
		BDA	46.02	21.04	16.10	87.70
		BDD	44.99	17.53	16.50	87.00
C	12	BIC	58.00	11.85	38.70	72.50
		BDA	45.30	11.35	28.40	62.40
		BDD	44.66	14.64	21.80	75.60
D	12	BIC	65.41	17.17	20.80	88.50
		BDA	40.71	15.37	17.40	64.00
		BDD	41.42	18.78	12.70	68.40

* n = number of implants in each group

**Percentage values of mean and standard deviation (SD)

FIGURES

Figure 1:

Implant design. All the implants had the same basic form and topography (grit-blasted/acid-etched), but possessed four different surface coatings performed in the indentations that were placed at 2.3mm from the top with a depth of 0.18mm and a height of 1.5mm.

Figure 2:

SEM images. (A) View of the microstructured surface provided by the grit-blasting/acid-etching process (magnification 1.000x); (B) The same microstructured surface in higher magnification (10.000x); (C) The microstructured surface after coating with HA (magnification 1.000x), note the uniform coating not changing the original morphology; (D) The microstructured surface after coating with HA and adsorption of the bioactive peptide (magnification 10.000x).

Figure 3:

Histological images (*Stevenel's blue* and *Alizarin red S* staining) obtained in a close-up view of the indentation area of each experimental surface. (A) Group A implant (microstructured surface modified with a “low concentration” of the bioactive peptide). Observe a strict contact between bone and implant and a high histological bone density with just a few marrow spaces adjacent to the implant surface; (B) Group B implant (microstructured surface in conjunction with the nano-crystalline HA coating). Observe a high percentage of bone-to- implant contact and central canals of different diameters; (C) Group C implant (microstructured surface only). Observe a superior number of marrow spaces, which presents bigger diameters when compared to the other histological images; (D) Group D implant (microstructured surface modified with a “high concentration” of the bioactive peptide). Observe good levels of bone-to-implant contact and histological bone density.

Figure 4:

Histograms showing the dispersion of bone density (BD) values for all implant surface groups. (A) In group A seven implants from 12 showed 40-60% of BD, three implants achieved more than 70% and no

implants had less than 30%; (B) In group B five implants from 12 showed 40-60% of BD, two implants achieved more than 70% and three implants had less than 30%, (C) In group C six implants from 12 showed 40-60% of BD, no implants achieved more than 70% and two implants had less than 30%; (D) In group D six implants from 12 showed 40-60% of BD, no implants achieved more than 70% and three implants had less than 30%.

ARTIGO 2 EM INGLÊS

TITLE PAGE

The dynamics of bone remodeling around biofunctionalized implant surfaces. A fluorescence analysis in a dog model.

Raquel R. M. Barros¹; Arthur B. Novaes Jr²; Vula Papalexiou³; Sérgio L. S. Souza²; Mário Taba Jr.²; Daniela B. Palioto²; Márcio F. M. Grisi²

1 - Graduate student of Periodontology, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

2- Professor of Periodontology, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

3- Professor of Periodontology, Center of Biologic and Health Science, School of Dentistry, Catholic Pontifical University, PR, Brazil.

Corresponding author: **Dr. Arthur B. Novaes Jr.**

Address: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Av. do Café, S/N, 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Fax number: +5516 3602-4788

E-mail: novaesjr@forp.usp.br

Short running title: **Influence of a biofunctionalized implant surface on bone remodeling**

ABSTRACT

Background: The aim of this study was to evaluate the bone remodeling around different implant surfaces by a fluorescence analysis.

Material and Methods: The mandibular bilateral premolars of 8 dogs were extracted and after 12 weeks each dog received 6 implants. The 4 experimental groups were constituted of implants with the same microstructured topography with or without some concentration of a bioactive peptide. During the healing period of 2 months, polychromatic fluorescence labeling was performed to investigate the dynamics of bone remodeling around the different implant surfaces. The bone markers were administered on the third day after implant placement and then after 1, 2, 4 and 6 weeks.

Results: New bone formation was determined histomorphometrically by bone markers quantifications adjacent and distant to the implants surfaces. In general, the intra-group analysis showed a pattern of fluorochrome incorporation among the different groups. However, the comparison between the groups revealed a statistically significant difference in favor of the microstructured surface modified with a “low concentration of a bioactive peptide” at the adjacent area in the 4-week period only ($p < 0.001$). Additionally at 3-day and at 6-week periods this group also achieved numerically superior values of fluorochrome incorporation.

Conclusion: Bone remodeling is an active process resulting from the alternation of resorptive and formative activities. There is a similar pattern of bone remodeling among the microstructured surfaces, biofunctionalized or not; however the addition of an adhesive peptide in “low concentration” favored the bone formation adjacent to the implants when compared to the other surfaces during the period evaluated.

Key words: Animal experimentation; Bone remodeling; Dental implants; Fluorescence

INTRODUCTION

Upon implantation, the surfaces of synthetic materials invariably become coated with a thin proteinaceous film¹. Protein orientation will be dependent on the particular binding surface, and various surface characteristics may modify their biologic activity first in relation to cell attachment and in sequence in bone apposition². When dealing with titanium, which is a commonly used biocompatible metal, the formation of a superficial oxide layer is expected and the interaction of cells with this layer is mediated by the existent surface proteins, the extracellular matrix proteins².

A common theme in the engineering of cell and tissue behavior at device surfaces is to modify the material to selectively interact with a specific cell type through biomolecular recognition events. Typically, peptides containing the cell-binding domains found in the extracellular matrix proteins are immobilized on the material to promote cell adhesion via ligand-receptor interactions^{3,4}.

According to the parameters used to evaluate osseointegration, very good results have been achieved with microstructured implant surfaces provided by the grit-blasting/acid-etching process. However, the surface topography is not the only surface characteristic that influences the bone apposition around titanium implants. Chemical and biochemical composition of implant surface may also play a crucial role in bone formation around implants, especially when the early stages of this process are considered^{1,5}. Based on this, surface functionalization using different peptides, for example, are now being investigated.

Some in vitro studies are focusing on the cell recruitment ability onto implant-modified surfaces^{6,7}. These surfaces have been obtained through different processes, frequently involving a biofunctionalization with adhesive peptides. Schuler et al⁷ investigated cell adhesion and spreading patterns of epithelial cells, fibroblasts and

osteoblasts on a biomimetically modified surface (containing a RGD bioactive peptide sequence), and on smooth and rough titanium surfaces. As control surfaces, bare titanium and bio-inactive surfaces were used. In general, an increase in cell number and more spreading of cells were observed on bioactive substrates (containing RGD) compared to bio-inactive surfaces. More fibroblasts were present on smooth than on rough topographies, whereas for osteoblasts the opposite tendency was observed. Osteoblast attachment and footprint areas increased with increasing RGD-peptide surface density. They concluded that surface topography and (bio) chemistry are key factors in determining cell response to an implant.

Animal studies support the hypothesis that the biofunctionalization of implant surfaces could be an advantageous⁸⁻¹⁰. Park et al⁸ evaluated the osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein that were placed in rabbit tibiae. The removal torque values as well as the percentages of bone-implant contact of the test group were better than those found for the implants that were not biofunctionalized. Germanier et al¹⁰ compared RGD peptide polymer modified implant surfaces with sandblasted and acid-etched implant surfaces placed in the maxillae of miniature pigs, and found that the biofunctionalization may promote enhanced bone apposition during the early stages of bone regeneration.

Fluorescence labeling of bone is a method for bone morphometry that provides an understanding of the chronological history of bone remodeling¹¹, as well as about the early stages of the establishment of bone-to-implant interface. The process of bone formation initiates with the formation of a non-calcified matrix by the osteoblasts, which will later mineralize as a result of apatite deposition, and during this formation phase fluorochromes can be accumulated. According to Nkenke et al¹² “during the

mineralization process, the fluorescent dyes are incorporated in the front of mineralization by chelation". By marking different time intervals, the sequential administration of different fluorescent dyes allows to follow the direction and the topographic localization of new bone formation.

The purpose of this study was to analyze, in a dog model using polyfluorochrome sequential labeling, the bone remodeling process around implant surfaces containing a low and a high concentration of a bioactive peptide and also to compare them with other implant surfaces such as a microstructured surface created by a grit-blasting/acid-etching process.

MATERIALS AND METHODS

Implant Design and Manufacturing

All implants were manufactured from commercially pure titanium following the XiVE design (DENTSPLY Friadent, Mannheim, Germany) and measured 4.5mm X 9.5mm. The implants were characterized by an indentation placed 2.3mm from the top of the implant with a depth of 0.18mm and a height of 1.5mm (Figure 1). In this indentation 4 different coatings were performed constituting the 4 different implant groups A, B, C and D (Table 1). Firstly, the indentations of all 4 groups were lined by the microstructured Friadent plus surface (DENTSPLY Friadent, Mannheim, Germany) provided by the grit-blasting/acid-etching process. The biofunctionalization of the implant surface was done by the absorption of a bioactive peptide to nano-crystalline HA coatings. The bioactive peptide could also be described as a sequence of aminoacids related to bone formation; however the detailed composition has not been disclosed by the manufacturer (proprietary processing). Thus, group A was constituted by the microstructured morphology and a “low concentration” of the bioactive peptide/ nano-crystalline HA coating, while group D has the same characteristics but a “high concentration” of the bioactive peptide. In group B the implants were lined by the microstructured morphology in conjunction with the nano-crystalline HA coating without the bioactive peptide absorption and, finally, in group C they were prepared only with the Friadent plus surface.

The study was blinded, thus all the professionals involved, from the surgeon to the examiner of the fluorescence images, had no knowledge of the constitution of the groups. The different coatings that characterized the 4 different implant surfaces were only revealed when the fluorescence analysis was finished.

Surgical Procedure

The study protocol was approved by the Institution's Animal Research Committee and involved 2 surgical interventions that were performed in 8 young adult male mongrel dogs, weighing approximately 12 kg. The animals presented intact maxillas, no general occlusal trauma, and no oral viral or fungal lesions and were in good general health, with no systemic involvement as determined by a veterinarian following clinical examination.

In the first surgery, after sedation the dogs were anesthetized with thiopental *iv* (1 ml/kg; 20 mg/kg thiopental diluted in 50 ml saline). Subsequently, full-thickness flaps were bilaterally elevated in the area of the first to fourth mandibular premolars. The teeth were sectioned in a buccolingual direction at the bifurcation so that the roots could be individually extracted, without damaging the bony walls, using a periosteal elevator. The flaps were repositioned and sutured with non-absorbable 4-0 sutures.

After a healing period of three months, the animals received 20,000 IU penicillin and streptomycin (1.0 g/10 kg) the night before the second surgeries. This dose provides antibiotic coverage for 4 days, thus another dose was given 4 days later to extend the coverage for 8 days. After repeating the same sedation and anesthesia used in the first surgeries, horizontal crestal incisions were bilaterally performed from the distal region of the canine to the mesial region of the first molar. Three implants were randomly inserted in each side of the mandible of each animal. Thus the locations and sides of the mandibles of the animals were treated with different sequences of implant groups. A total of 48 implants were used in the experiment, twelve for each group (A, B, C or D). The flaps were sutured with non-absorbable sutures and the implants were left to heal in a submerged position. The animals were maintained on a soft diet for 14 days when the sutures were removed. The healing was evaluated periodically and the remaining teeth

were cleaned monthly with ultrasonic points. During the 2-month healing period fluorescence bone markers were administered¹³ to observe the degree and extent of new bone formation. On the third day after implant placement, 20 mg calcein green/Kg body weight was administered intravenously (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); at first week, 20 mg of red alizarin S/Kg body weight (Sigma); at 2 weeks, 20mg oxytetracyclin HCl/Kg body weight (Sigma); at 4 weeks, 20 mg calcein green/Kg body weight (Sigma); and at 6 weeks, 20 mg calcein blue/Kg body weight (Sigma). All dyes were prepared immediately before use with 2% sodium bicarbonate or saline. After preparation, pH was adjusted to 7.4 and the solution was filtered through a 0.45µm filter (Schleider & Schuell GmbH, Dassel, Germany). Each dog received a total dose of 3 ml.

Sacrifice and Histological Processing

The animals were sedated and then sacrificed with an overdose of thiopental eight weeks after implant placement. The hemi-mandibles were removed, dissected and fixed in 4% phosphate-buffered formalin pH 7, for 10 days, and transferred to a solution of 70% ethanol until processing. The specimens were dehydrated in increasing concentrations of alcohol up to 100%, infiltrated and embedded in LR White resin (London Resin Company, Berkshire, England), and hard-sectioned using the technique described by Donath & Breuner¹⁴. The specimens were ground to about 50 µm for fluorescence microscopy¹².

Fluorescence analysis

Fluorescence microscopic images were longitudinally captured from each implant through a video camera Leica DC 300F (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany) joined to a stereomicroscope Leica MZFL III (Leica Microsystems GmbH,

Nussloch, Germany), using appropriated barrier filters. The filters of wavelengths used were **D** for oxytetracyclin HCl that has an excitation level between 355-425 nm and **A** for calcein blue that has an excitation level between 340-380 nm. Considering that the calcein green was used in 2 different times (at 3 days after implant placement and at 4 weeks after implant placement), another images were obtained by the confocal laser scanning microscope (CLSM), which obtains successive images of different planes of the same sample, being able to build three-dimensional images. Once the red alizarin S was administered between the 2 administrations of calcein green, it was possible to distinguish the bone marked by calcein green in the different periods using the images provided by the CLSM. All the images were adjusted and analyzed through the Image J program (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) to determine the percentages of bone marked at the indentations.

The marked bone was determined within 2 rectangles, one of them within the indentation (II), occupying its total area, and the other outside the indentation (OI) as mirror image of the first. The marked bone measurements evaluated the percentages of fluorescent bone in relation to the total area. A single examiner, with no knowledge if the sections were from groups A, B, C or D made the measurements.

Statistical Analysis

All measurements were statistically evaluated using the analysis of variance, ANOVA, with 2 factors (surface treatment and label/time) and Tukey test was used for multiple comparisons among the means. The confidence level was 95%.

RESULTS

First of all it is important to emphasize that the microstructured morphology was not changed due to the surfaces' biofunctionalization process. The FRIADENT plus surface morphology was fully maintained following the application of a thin HA + bioactive peptide coating as seen in the SEM images (Figure 2).

The analysis under fluorescent microscopy showed intense bone remodeling for all the groups evaluated. The old bone always appeared darker and without labeling (Figure 3). Alizarin had a red color in a smeared diffuse pattern; clearly evident green bands generally represented calcein green; oxytetracyclin showed thin yellow-green lines and finally calcein blue was characterized by a blue color in a very diffuse pattern (Figure 3). In many specimens the secondary osteons were demonstrated by the deposition of the labels in a concentric arrangement (Figures 3 and 4).

New bone formation was determined histomorphometrically by bone markers quantifications. Sequentially, they represented the healing pattern of each different group. The percentages of newly formed bone inside the indentation (II) adjacent to the implant interface were described in Table 1 and were represented in Figure 5. In addition, the percentages of newly formed bone outside the indentation (OI) and distant from the implant interface are described in Table 2 and in Figure 6.

The comparison of the bone marked found in area II between the groups revealed a statistically significant difference in favor of group A in the 4-week period only ($p < 0.001$), although at 3-day and at 6-week periods group A also achieved numerically superior values of fluorochrome incorporation.

The evaluation of the OI area showed quite similar results for all the groups considering all the application periods. There were no statistically significant differences between the groups.

Finally, the analysis within the groups that represented the effect of each different surface at the area II (adjacent to the implant surface) compared to the area OI (distant to the implant surface) demonstrated no statistically significant differences between them.

DISCUSSION

The use of bone markers is essential for fluorescence and CLSM analysis. Their application at different periods permits evaluation of bone formation and remodeling throughout different stages of healing. Alizarin, calcein green, oxytetracyclin and calcein blue fluorochromes present different colors and supply sequential information when applied intercalated. The bone markers used in the present study can be compared because they bind to calcium ions by chelation¹⁵, which allows to properly evidence active mineralization areas¹².

This study evaluated the dynamics of bone formation around different implant surfaces (groups A, B, C and D). Concisely, the fluorochrome incorporation showed a pattern among the different groups of implant surfaces along the period of evaluation from 3 days to 6 weeks. Until the first week, the percentage of marked bone remained between 10 and 13% in all the groups. However at the 2-week evaluation a significant increase in bone formation was detected in all 4 groups. At this moment each group achieved their highest value of marked bone that represented individually their mineralization peak. At the 4-week evaluation, the level of marked bone decreased considerably for all groups, but for group A in which the decrease was not so pronounced. While groups B, C and D showed their lowest marks at this period, around 6%, group A exhibited 13% of marked bone. Finally at the 6-week period another increase in mineralization activity occurred for all groups (B= 16%, C=18%, D=12%), with slightly better results for group A (21%).

The early phases of bone formation around implants are still poorly understood. Frequently, for example, the studies involving different implant surfaces analyze only the osseointegration determined by the levels of bone-to-implant contact achieved at the end of the experiment. The fluorochrome labeling study makes possible an investigation

of the differences in bone formation during the process of bone remodeling, considering 4 or 5 different periods of evaluation. In a different way Abrahamsson et al¹⁶ evaluated histometrically and morphometrically the healing between 2h and 12 weeks after implant placement in dogs. The dogs were sacrificed and biopsies were obtained in sequential times. From the non-decalcified sections the proportions of woven bone, lamellar bone, non-mineralized structures (residual tissue) and bone remnants were enumerated and from the decalcified sections the content of osteoblasts, fibroblast-like mesenchymal cells, and mineralized tissue components were distinguished between others.

Taking into account the results obtained in each period of bone remodeling around implants in this study and comparing them to Abrahamsson et al¹⁶ it was observed that during the first week immediately after implant placement (3- and 7-day periods of evaluation), significant degrees of mineralized components were already found at the area investigated. Bone values ranging from 10 to 13% were achieved for all the groups. According to Abrahamsson et al¹⁶, at these first steps what could be expected is the presence of a clot becoming partially penetrated by vascular structures surrounded by fibroblast-like mesenchymal cells at its periphery (early granulation tissue), which could not provide substantial matrix mineralization at these premature step. Nevertheless at 1-week, the woven bone formation frequently began and the bone formation centers (primary osteons) were usually recognized¹⁶. At this moment, an increase in mineralized components could be noted, although provisional connective tissue matrix rich in vascular structures was still expected to be present. Abrahamsson et al¹⁶ described that, in this phase, the primary osteons all consistently were lined by osteoblasts. After 2 weeks the presence of trabeculae of newly formed bone was predictable and occupied the whole architectural space available. At this time an active

process of mineralization was present¹⁶. These observations supported the results found in the present study that showed the 2-week period as the mineralization peak for all the groups. In sequence to this ongoing process, at the 4-week period of evaluation a decrease in mineralization levels was observed in the present study, which is explained by the fact that a large volume of woven bone had already been replaced by lamellar bone¹⁶. Subsequently, for the next 4 weeks the formation of secondary osteons and an undergoing remodeling was found. In this process, bone formative and resorptive phases were systematically intercalated and the level of mineralization tended to increase in a slower but gradual way as observed in the 6-week findings of the present study.

Bone remodeling means substitution of bone tissue that improves its quality in both mechanical and metabolic properties¹⁷. Remodeling involves the recruitment of osteoclasts that form a cavity on the trabecular surface. At the end of this resorptive phase, the osteoclasts move on or disappear, and after a short intermission or reversal phase, the osteoblasts start depositing new bone (formative phase)¹⁷. This coupling phenomenon is of special interest because it involves cells of rather different origin in both cortical and trabecular remodeling units. The initiation of the coupled resorptive and formative activities is obviously based on a concerted action of multiple factors engaged in osteoclast activation, osteoblast proliferation and differentiation, matrix formation, and mineralization. Hence, the superior marked bone found for group A at the 4-week period could be understood as a positive balance for bone formation. It is unknown how the biofunctionalized implant surface with a “low concentration” of peptide of group A may have influenced positively the formative phase favoring significantly the level of mineralization of this group specifically at this period. Considering the mineralization itself, some basic requirements were considered to be

absolutely necessary, such as an adequate concentration of calcium and phosphate ions, the presence of calcifiable matrix and nucleating agents, and the control by regulators (ie, promoters and inhibitors)¹⁸.

The bone tissue types could be distinguished by the orientation of the collagen fibrils. In woven bone the collagen fibrils were oriented in a random or feltlike manner while the lamellar bone was characterized by 3- to 5-wide layers of parallel fibrils. Besides, in the fluorochrome labeling analysis the woven bone appeared in a diffuse rather than in a clearly delineated uptake although the lamellar bone showed well-defined fluorescent bands once the fluorochrome labels were restricted to the mineralization front¹⁷. These patterns for both woven bone and lamellar bone were observed in the present study. The woven bone was represented by the alizarin red that was administered 1 week after the implant installation and exhibited very diffuse labeling. On the other hand the lamellar bone was represented by oxytetracyclin that was administered 2 weeks after implant installation and also by the calcein green administered 4 weeks after implant installation. The images of both fluorochromes showed a clearly different aspect determined by better organized, well-defined fluorescent bands. This finding was in agreement with the bone formation process in bone defects described by Schenk et al¹⁹ that presumed firstly the establishment of woven bone followed by lamellar bone. The woven bone was formed more rapidly, and the interval between osteoid deposition and mineralization was short. In contrast, lamellar bone formation took place more slowly and mineralization occurred along a clearly delineated front respecting the parallel and/or concentric layers of the collagen fibrils.

It could be concluded that all the implants surfaces studied from the biofunctionalized to the microstructured created by grit-basting/acid-etching process

have a similar pattern in bone remodeling that could be evidenced by fluorochrome labeling analysis. The biofunctionalized implant surface with an adhesive peptide in “low concentration” favored the bone formation adjacent to the implants when compared to the other surfaces during the period evaluated, which means that that different concentrations of bioactive peptide lead to different results.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by DENTSPLY Friadent and by FAPESP (process numbers 05/60839-8 and 06/56020-6).

REFERENCES

1. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res.* 2000; 49:155-66.
2. MacDonald DE, Markovic B, Allen M, Somasundaran P, Boskey AL. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. *J Biomed Mater Res.* 1998;41:120-30.
3. Rezanian A, Healy KE. Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells. *Biotechnol Prog.* 1999;15:19-32.
4. Rezanian A, Thomas CH, Branger AB, Waters CM, Healy KE. The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein. *J Biomed Res.* 1997; 37: 9-19.
5. Goldberg V, Stevenson S, Feighan J, Davy D. Biology of grit-blasted titanium alloy implants. *Clin Orthop Relat Res.* 1995; 319:122-9.
6. Bagno A, Piovan A, Dettin M, et al. Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides. *Bone.* 2007;40:693-9.
7. Schuler M, Owen GR, Hamilton DW, et al. Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. *Biomaterials.* 2006;27:4003-15.
8. Park JM, Koak JY, Jang JH, Han CH, Kim SK, Heo SJ. Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21:859-66.

9. Becker J, Kirsch A, Schwarz F, et al. Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs. *Clin Oral Investig.* 2006;10:217-24.
10. Germanier Y, Tosatti S, Brogini N, Textor M, Buser D. Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces. A histomorphometric study in miniature pigs. *Clin Oral Impl Res.* 2006;17:251-7.
11. Suzuki K, Aoki K, Ohya K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone.* 1997;21:507-14.
12. Nkenke E, Kloss F, Wiltfang J, et al. Histomorphometric and fluorescence microscopic analysis of bone remodelling after installation of implants using an osteotome technique *Clin Oral Impl Res.* 2002;13:595–602.
13. Cho K-S, Choi S-H, Chai J-K, Wikesjö UME, Kim C-K. Alveolar bone formation at dental implant dehiscence defects following guided bone regeneration and xenogenic freeze-dried demineralized bone matrix. *Clin Oral Impl Res.* 1998; 9:419-28.
14. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982;11:318-26.
15. Sun TC, Mori S, Roper J, Brown C, Hooser T, Burr DB. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information? *Bone.* 1992;13:443-6.
16. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Impl Res.* 2004;15:381–92

17. Schenk RK. Bone regeneration: biologic basis. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK, eds. Guided bone regeneration in implant dentistry. St Louis: Quintessence Publishing Co, 1994:49-100.
18. Kahn AJ, Fallon MD, Teitelbaum SL. Structure-function relationships in bone: An examination of events at the cellular level. In: Peck WA, ed. Bone and mineral research. Amsterdam: Elsevier; 1983:125-174.
19. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. Int J Oral Maxillofac Implants. 1994;9:13-29.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Implant design. All the implants had the same basic form and topography (grit-blasted/acid-etched), but possessed four different surface coatings performed in the indentations that were placed at 2.3mm from the top with a depth of 0.18mm and a height of 1.5mm.

Figure 2

SEM images. Note the uniform coating not changing the original FRIADENT plus morphology.

(A) FRIADENT plus surface (magnification 1.000x); (B) FRIADENT plus surface after coating with HA/bioactive peptide (magnification 10.000x).

Figure 3

Fluorescence analysis. New bone formation was determined histomorphometrically by bone markers quantifications inside and outside the indentations. The old bone always appeared darker and without labeling. (A) Alizarin red had a red color in a smeared diffuse pattern; (B) Oxytetracyclin showed thin yellow-green lines; (C) Calcein green was generally represented by clearly evident green bands and (D) Calcein blue was characterized by a blue color in a very diffuse pattern.

Figure 4

Fluorescence analysis. (A) Alizarin red; (B) Image obtained from the confocal microscope showing the alizarin red and calcein green together; (C) Calcein green

Figure 5

Graph showing the percentages of newly formed bone inside the indentation (II), adjacent to the implant interface, along the period of evaluation.

Figure 6

Graph showing the percentages of newly formed bone outside the indentation (II), distant to the implant interface, along the period of evaluation.

Tables

Table1: Four experimental implant surface groups

Group	Implant surface characteristics
A	FRIADENT plus surface morphology + HA coating + “low concentration” bioactive peptide
B	FRIADENT plus surface morphology + HA coating
C	FRIADENT plus surface (grit-blasting/acid-etching process)
D	FRIADENT plus surface morphology + HA coating + “high concentration” bioactive peptide)

Table 2: The percentages of newly formed bone inside the indentation (II), adjacent to the implant interface, along the period of evaluation

	adjacent measurements				
	bone marked - confocal/fluorescence analysis				
	3 days	1 week	2 weeks	4 weeks	6 weeks
A	12.97	11.30	26.41	13.62	21.62
B	10.17	13.20	23.68	6.81	16.07
C	10.89	12.16	26.49	6.39	18.22
D	10.72	11.68	21.19	5.98	12.24

Table 3: The percentages of newly formed bone outside the indentation (II), distant to the implant interface, along the period of evaluation.

	distant measurements				
	bone marked - confocal/fluorescence analysis				
	3 days	1 week	2 weeks	4 weeks	6 weeks
A	10.45	7.21	35.78	6.86	22.73
B	10.38	7.36	35.52	6.72	25.52
C	9.99	7.04	33.84	6.06	26.37
D	10.30	7.17	34.18	6.30	24.14