



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

Ana Flávia Piquera Santos

**Estudo *in vitro* e *in vivo* da superfície de
implantes modificados por feixe de laser com e
sem deposição de hidroxiapatita.
Caracterização topográfica, cultura de células e
análise histométrica**

Araçatuba- SP
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

Ana Flávia Piquera Santos

**Estudo *in vitro* e *in vivo* da superfície de
implantes modificados por feixe de laser com e
sem deposição de hidroxiapatita.
Caracterização topográfica, cultura de células e
análise histométrica**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, como parte dos requisitos para a obtenção do título de “Doutor em Odontologia” – Área de Concentração Implantodontia

Orientador: Prof. Ass. Dr. Francisley Ávila Souza

Araçatuba- SP
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Santos, Ana Flávia Piquera.
S237e Estudo in vitro e in vivo da superfície de implantes modificados por feixe de laser com e sem deposição de hidroxiapatita. Caracterização topográfica, cultura de células e análise histométrica / Ana Flávia Piquera Santos. – Araçatuba, 2023
88f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Francisley Ávila Souza

1. Implantes dentários 2. Cicatrização 3. Nd-YAG lasers
4. Osseointegração I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

Dedico:

À meus pais, por todo esforço que fizeram para me ajudar, por todo carinho, amor, estrutura emocional, compreensão e suporte que me forneceram durante essa fase e ainda fornecem. Muito obrigada por todo apoio que me dão!

À minha avó Clarisse, por tudo o que fez e tem feito por mim, por toda atenção, carinho, compreensão e amor.

*Agradecimentos
Especiais*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente à **Deus**, por ter permitido que chegasse até aqui, por todas as bênçãos a mim fornecidas, por ter me dado forças todo tempo, pela proteção, por ter colocado pessoas tão maravilhosas em meu caminho, por estar comigo em todos os momentos, me ajudando a superar os obstáculos e me guiando o tempo todo. Obrigada meu Deus por tudo!

À meus pais, **Branca Piquera e Laércio Marques**. Eu posso passar a vida toda tentando, mas nunca vou conseguir retribuir tudo o que vocês fizeram e tem feito por mim. Sei que não foi fácil para vocês, sei que fizeram de tudo para que eu pudesse me formar e continuaram me apoiando durante todos esses anos de mestrado e doutorado. Além da graduação, passar por um mestrado inteiro sem bolsa e mais 4 anos de doutorado com apoio financeiro foi um desafio tanto para vocês quanto para mim, mas vocês nunca me deixaram na mão, nunca permitiram que me faltasse nada, seja financeiramente ou emocionalmente. Sempre que precisei vocês estavam ali, prontos para me ajudar a superar qualquer problema, sempre me ouvindo reclamar das coisas que estavam acontecendo, sempre me dando conselhos ou até mesmo broncas que, cá entre nós, foram bem merecidas. Eu só sou o que sou graças a vocês. Obrigada por serem pais maravilhosos! Obrigada por estarem sempre comigo, nunca deixando faltar nada- amor, carinho, companheirismo. Obrigada por serem os melhores pais e amigos que eu poderia ter na minha vida. Todas as minhas vitórias foram e serão vitórias de vocês! Amo vocês!!

À minha avó, **Clarisse Tarifa**, minha segunda mãe, que sempre esteve comigo, me apoiando, me ajudando e me ensinando. Muito obrigada por tudo que fez e continua fazendo por mim, por todo carinho, amor, atenção e companheirismo. A

senhora e meus pais, são as pessoas mais importantes da minha vida e eu só tenho a agradecer.

Aos meus falecidos avôs e avó, **Antônio Piquera, Pedro Cândido e Aparecida Marques** (*in memoriam*), que, por mais que não estejam comigo há muitos anos, participaram efetivamente da minha educação quando criança, estando sempre presentes e fazendo de tudo por mim. Lembro de vocês a todo momento. Só Deus sabe a falta que vocês fazem e sei que se estivessem aqui, estariam muito orgulhosos de mim! Parte de mim acredita que vocês estão comigo, como meus anjos mais que especiais, observando e guiando meus passos. Amo vocês eternamente.

Aos meus tios, **Sinezia Marques e Antônio Cruz**, vocês estão mais próximos (em Km) a mim do que meus pais e sempre disseram que poderia contar com vocês para o que precisasse. Só tenho a agradecer por tudo o que fizeram por mim e por estarem sempre presentes.

À minha **família**, que, por mais que tenha mais contato com alguns do que com outros, sei que posso contar com todos vocês. Obrigada por todo apoio, carinho e atenção!!

Ao meu orientador, **Prof. Francisley Ávila Souza**, pela confiança depositada a mim, por toda ajuda, compreensão e paciência, desde 2015, quando me ofereceu um projeto de iniciação científica. Foi graças à iniciação científica que decidi fazer pós-graduação e devo tudo ao senhor, professor. Muito obrigada por estar presente, principalmente quando mais precisei e nos momentos de desespero. Obrigada por estar disposto a fazer de tudo para ajudar seus orientados, pelo altruísmo e preocupação conosco. Obrigada também pela confiança depositada em mim quando ofereceu a chance de realizar o Capes-PrInt em Viena. Se cheguei até aqui hoje, foi graças ao senhor e ao nosso grupo de pesquisa, que o senhor sempre incentivou. E

obrigada por toda paciência que tem demonstrado comigo, me socorrendo nos momentos de aflição, agitação e pequenos surtos, sempre com muita calma e tentando controlar a situação me mostrando o lado positivo de tudo. O senhor é uma pessoa maravilhosa, um exemplo de humanidade e respeito.

Aos meus amigos de Ilha Solteira, especialmente à **Karol Satélis**, uma amiga de infância, que esteve comigo em todos os momentos. Muito obrigada pela sua amizade, você é muito especial para mim. Sei que posso contar com você pra qualquer coisa, assim como pode contar comigo. Obrigada!

À minhas ex-companheiras de apartamento, **Aretuza Marques e Thais Cougo**, pela amizade que começou durante a graduação e segue firme mesmo depois de todos esses anos. Mesmo à distância continuam se fazendo presentes e eu valorizo muito essa amizade. Obrigada pelo companheirismo, por me aturarem, e pela paciência. O “Apartamento 31” vai ficar para sempre na memória, guardado com muito carinho. Amo vocês!

À minha companheira de apartamento e grande amiga, **Lara Cristina Cunha Cervantes**, por toda ajuda e companheirismo. Uma amizade que iniciou por conta de um projeto de pesquisa que fizemos juntas em 2020 e que se mantém firme desde então. Larinha, saiba que você é muito importante para mim!! Minha companheira de doutorado sanduíche e agora de apartamento. Todos os momentos e perrengues que já passamos juntas renderam muitas histórias para contar. Você é uma pessoa com uma energia contagiante e com um coração muito bom! Sem dúvidas merece todo sucesso do mundo!! Obrigada pelos conselhos, por sempre me ajudar, por estar comigo quando preciso, por saber me ouvir, pela compreensão e por todos os conselhos. Amo você!

À minha amiga e parceira de laboratório em Viena, **Mariane Beatriz Sordi**, por todos os ensinamentos, conselhos e por sempre estar comigo quando precisei. Mari, você tem um coração enorme e com certeza vai muito longe. Sempre me socorreu quando precisei de ajuda com os experimentos, me deu dicas valiosas para escrita de artigos e me ajudou muito no processo seletivo para a bolsa da Osteology Foundation. Muito obrigada mesmo, por tudo!! Espero que esteja colhendo todos os bons frutos provenientes do seu trabalho e esforço. Desejo todo sucesso do mundo para você!

A todos os amigos que fiz durante esses anos na pós-graduação, **Carolina Barros, Bruna Junger, Luana Oliveira, Izabella Sol e Natália Sanches**. O apoio, a presença e o companheirismo de vocês foram fundamentais. “Não há solidão mais triste do que a do homem sem amizades. A falta de amigos faz com que o mundo pareça um deserto” - Francis Bacon.

Ao nosso grupo de pesquisa, **Henrique Hadad, Laís Kawamata, Máisa Pereira, Maria Eduarda de Freitas, Paulo Honda, Harrisson Valeriano e Letícia Rodrigues**, vocês foram fundamentais nessa jornada. Sem o apoio e a ajuda de vocês todo esse processo seria mais lento. Além disso, os momentos juntos, a amizade que foi sendo desenvolvida ao longo do tempo foi muito importante para mim. Vocês são importantes para mim. Cada um com seu jeitinho diferente de lidar com as coisas, a habilidade que desenvolvemos em trabalhar em grupo, a parceria entre nós, tudo isso contribuiu para o que somos hoje. E não só na faculdade, mas fora também. Só tenho a agradecer a vocês por tudo. “A amizade pode existir entre as pessoas mais desiguais. Ela as torna iguais” - Aristóteles.

À Profa. **Roberta Okamoto**, por sempre ter me recebido de braços abertos no departamento de Ciências Básicas, disposta a ajudar no que fosse preciso e sou muito grata a tudo que fez por mim. Sua habilidade em analisar tudo de maneira minuciosa

me ajudou muito a melhorar os projetos de mestrado e doutorado. Obrigada por toda bondade e gentileza que a senhora tem, por tratar os alunos sempre com muita educação e carinho, por todas as dicas e conselhos, por todo apoio, pela educação e carinho que teve comigo. A senhora é uma pessoa maravilhosa e merece todo meu respeito e gratidão.

Ao Prof. **Idelmo Rangel Garcia-Junior**, gostaria de expressar minha gratidão por me ajudar a alcançar este marco em minha jornada acadêmica. Agradeço imensamente pela dedicação, tempo e esforço dedicado à minha defesa, por avaliar meu trabalho, e pela contribuição com sugestões valiosas para melhorar meu desempenho e por compartilhar seus conhecimentos e experiências.

Às Professoras **Juliana Zorzi e Thallita Pereira Queiroz**, por terem aceitado o convite para compor a banca de defesa de tese. Infelizmente não tivemos muito contato, porém sempre ouço falarem de vocês com muito carinho e admiração. Tenho certeza de que tenho muito a aprender com vocês.

À Profa. **Daniela Ponzoni**, que sempre esteve presente no departamento, sempre acessível e disposta a fazer o que fosse preciso para ajudar os alunos, independentemente de serem orientados ou não. Obrigada pelo apoio nas clínicas da pós-graduação, nos atendimentos no 10A durante meu mestrado e por esse ano como PAADES. Obrigada por ter confiado em mim e me dado a oportunidade de ter um pouquinho de experiência com a docência, corrigindo provas e dando revisões para os alunos. Sempre esteve presente, até mesmo nos meus momentos de desespero, andando nos corredores do departamento, chorando ou extremamente agitada. Todo conhecimento e apoio que me deu foi fundamental nesta caminhada. Que toda bondade existente nesse coração seja retribuída em bondade em dobro, muito amor e uma infinidade de coisas boas.

Ao Professor **André Luis da Silva Fabris**, pela disponibilidade em ser banca da dissertação e membro suplente da banca examinadora da minha tese e por toda ajuda e confiança depositada a mim durante as semanas que acompanhei os plantões CTBMF sob sua supervisão.

Ao Professor **Fábio Roberto de Souza Batista**, meu sincero agradecimento pelo suporte, por toda ajuda durante a execução do projeto que originou minha dissertação e por ter tido a oportunidade de aprender com você.

Ao Professor **Reinhard Gruber**, minha eterna gratidão por ter me recebido no Oral Biology Department na Medical University of Vienna. Por ser um excelente mentor e uma pessoa incrível, só tenho a agradecer por todo ensinamento e treinamento que recebi sob sua orientação. Jamais esquecerei o que o senhor fez por mim e por ter permitido que eu vivenciasse a melhor experiência da minha vida que foi estar em um país completamente diferente, ter contato com uma cultura diferente e me comunicar em um idioma diferente. Os crescimentos pessoal e profissional foram imensuráveis! Em Viena eu tive certeza de que quero direcionar minha carreira para a pesquisa. Tenho certeza de que as lições aprendidas durante este ano em Viena me acompanharão por toda a vida.

À **Layla Panahipour**, por ter me recebido no laboratório e dividido seu escritório comigo. Muito obrigada por tudo que fez por mim, por ter me tratado como uma filha, por todo cuidado e carinho desde o dia em que cheguei em Viena. Nos momentos em que mais precisei, você estava lá, oferecendo suporte, ajuda e um ombro para chorar. Dear Layla, seu coração é enorme e sua bondade faz de você uma das melhores pessoas que já conheci e uma das pessoas mais inteligentes também. Jamais esquecerei tudo que fez por mim!

À meus companheiros de laboratório de Viena, **Jila Nasirzade, Zahra Kargarpour, Azarakhsh Oladzad Abbasabadi e Feng Shao**, pelo companheirismo no laboratório. Saber que eu iria encontrar vocês no laboratório era o que deixava meu dia melhor e mais leve. Agradeço muito por todo conhecimento compartilhado comigo e por estarem sempre por perto, dispostos a ajudar. Vocês sempre foram muito atenciosos e carinhosos e levarei comigo tudo que aprendi com vocês. As lembranças dos encontros e festinhas culturais ficarão guardadas para sempre na memória. "Os amigos são a família que escolhemos para nós mesmos." - Edna Buchanan

À minha psicóloga **Mariana Fachini**, que vem me acompanhando desde 2018, me ajudando a manter a calma e me dando todo suporte necessário para continuar. Você foi muito importante nessa etapa da minha vida. Me ajudou a descobrir muita coisa sobre mim e me fez acreditar mais na minha capacidade. Muito obrigada, Mari!

À todos os **colegas de mestrado e doutorado** do departamento de Diagnóstico e Cirurgia, que, por mais que exista graus diferentes de amizade, estamos sempre juntos no departamento, procurando ajudar uns aos outros e manter o ambiente mais leve e agradável. Muito obrigada por estarem lá sempre que precisei.

Aos professores de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial e Implantodontia, **Ana Paula Farnezi Bassi, Leonardo Perez Faverani, Osvaldo Magro Filho e Alessandra Marcondes Aranega**. A disponibilidade que vocês tem para ajudar nós, alunos, tanto de pós-graduação quanto de graduação, á vontade e habilidade de transmitir conhecimento, e o fato de estarem sempre presentes e acessíveis a nós faz com que a disciplina, o departamento, seja tão forte e o ambiente de trabalho seja agradável. Muito obrigada por toda atenção e por estarem sempre presentes, dispostos a ajudar no que for necessário.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** – FOA/Unesp, na pessoa do diretor **Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara**, pela oportunidade de cursar a graduação e pós-graduação em uma universidade de excelência, bem estruturada e com profissionais de qualidade.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual Coordenador **Prof. Associado Wirley Gonçalves Assunção**.

Aos **funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** pela disponibilidade, paciência e gentileza em todas as etapas da pós-graduação.

Aos **funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** por ajudarem sempre que necessário, por toda paciência e gentileza.

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia (**Paulo Gratão, Renato Gomes e Marco Ianer**). Só tenho a agradecer a vocês pelo carinho, atenção, por tudo que fizeram para me ajudar e por tornarem o ambiente de trabalho sempre agradável. Muito obrigada por toda paciência que tiveram comigo e por ensinar os procedimentos laboratoriais com tanta eficiência e calma.

Ao **Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa da **Profa. Dra. Roberta Okamoto**, por permitir a utilização do microscópio óptico para a captura das imagens das lâminas deste estudo e por todo suporte fornecido.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP**, pelo financiamento da minha pesquisa de iniciação científica e pelo auxílio de pesquisa regular, do qual esse projeto de pesquisa foi derivado (processos nº 2016/05264-4 e 2018/22108-1).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001, pela disponibilização de bolsas de estudos durante meu doutorado.

Ao programa **Capes-Print**, pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche por 1 ano na Medical University of Vienna, com bolsa de estudos e auxílios para passagens e seguro. Sem dúvidas foi a melhor experiência da minha vida e só tenho a agradecer.

Aos **pacientes**, pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas e a empatia. Minha eterna gratidão.

Epígrafe

*“Se seus sonhos não te assustam, eles não são grandes
o suficiente”*

Ellen Johnson Sirleaf

Santos AFP. Estudo *in vitro* e *in vivo* da superfície de implantes modificados por feixe de laser com e sem deposição de hidroxiapatita. Caracterização topográfica, cultura de células e análise histométrica [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2023.

RESUMO

A proposição deste trabalho foi avaliar o comportamento biológico *in vitro* e *in vivo* do tecido ósseo diante das superfícies usinada (MS), modificada por jateamento seguido de condicionamento ácido, disponível comercialmente (SBAS), modificada por feixe de laser (LS) e modificada por feixe de laser com recobrimento de hidroxiapatita (HA) pelo método biomimético sem tratamento térmico (LHS). Foi realizada previamente a microscopia eletrônica de varredura acoplada ao sistema de espectrometria de energia dispersiva de raios X (MEV/EDX) das superfícies e estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar o comportamento da linhagem celular osteogênica murina (MC3T3-E1) e células estromais derivadas da medula óssea (ST2), mediante exposição às superfícies experimentais. Para o estudo *in vivo*, foram utilizados 20 coelhos *Albinus* os quais receberam 40 implantes de 3,75x10mm em leitos cirúrgicos fresados na porção medial das tíbias direita e esquerda, sendo um implante de cada superfície em cada tíbia. Nos 10 animais pertencentes ao período de eutanásia de 4 semanas foi realizada a aplicação intramuscular dos fluorocromos calceína e alizarina. As tíbias com os implantes foram submetidas à análise microtomográfica seguido do processamento de inclusão em resina para obtenção de cortes calcificados e posterior análise por microscopia confocal a laser. Foi mensurada a extensão linear de contato entre tecido ósseo mineralizado e superfície do implante (ELCOMI) e área óssea neoformada (AON). Os valores obtidos foram levados à análise de variância e teste *t* de Tukey, adotando o nível de significância de 5%. O MEV mostrou diferenças entre as superfícies. No estudo *in vitro*, observou-se que o revestimento de HA não apenas reduziu a viabilidade das células MC3T3-E1 e ST2, como provocou a expressão e liberação de interleucina-6 (IL6) pró-inflamatória. A análise microtomográfica evidenciou diferença estatística na porcentagem de volume ósseo (BV/TV), na qual a superfície LHS foi estatisticamente superior à MS e SBAS no período de 2 semanas e a superfície LS estatisticamente superior à MS no período de 2 semanas. A ELCOMI dos implantes LHS e LS foram estatisticamente superiores a MS e SBAS no período de 2 semanas. No período de 4 semanas, houve diferença estatística entre as

superfícies LHS e LS em relação à superfície MS. A análise estatística da *AON* dos implantes mostrou diferença entre a superfície LHS e MS no período de 2 semanas. Deste modo, conclui-se que a adição de HA na superfície modificada por laser pode provocar uma maior resposta inflamatória e que as modificações experimentais LS e LHS favorecem a deposição de tecido ósseo periimplantar.

Palavras-chave: Implantes dentários. Cicatrização. Superfície. Nd-YAG lasers. Osseointegração.

Santos AFP. *In vitro* and *in vivo* study of the surface of implants modified by laser beam with and without hydroxyapatite deposition. Topographic characterization, cell culture and histometric analysis [thesis]. São Paulo State University, School of Dentistry, Araçatuba;2023.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* biological behavior of bone tissue on surfaces machined (MS), modified by blasting followed by acid etching, commercially available (SBAS), modified by laser beam (LS) and modified by laser beam coated with hydroxyapatite (HA) by the biomimetic method without heat treatment (LHS). Scanning electron microscopy coupled to the energy dispersive X-ray spectrometry system (SEM/EDX) of the surfaces and an *in vitro* study were performed in order to evaluate the behavior of the murine osteogenic cell line (MC3T3-E1) and stromal cells derived from bone marrow (ST2), upon exposure to experimental surfaces. For the *in vivo* study, 20 Albinus rabbits were used, which received 40 implants of 3.75x10mm in surgical beds milled in the medial portion of the right and left tibias, with one implant on each surface in each tibia. In the 10 animals belonging to the 4-week euthanasia period, intramuscular application of the fluorochromes calcein and alizarin was performed. The tibias with the implants were submitted to microtomographic analysis followed by resin inclusion processing to obtain calcified sections and subsequent analysis by confocal laser microscopy. The linear extension of contact between mineralized bone tissue and implant surface (BIC) and newly formed bone area (NBA) were measured. The values obtained were taken to analysis of variance and Tukey's t test, adopting a significance level of 5%. The SEM showed differences between the surfaces. In the *in vitro* study, it was observed that the HA coating not only reduced the viability of MC3T3-E1 and ST2 cells, but also provoked the expression and release of pro-inflammatory interleukin-6 (IL6). The microtomographic analysis showed a statistical difference in the percentage of bone volume (BV/TV), in which the LHS surface was statistically superior to the MS and SBAS in the 2-week period and the LS surface statistically superior to the MS in the 2-week period. BIC of the LHS and LS implants were statistically superior to MS and SBAS at the 2-week period. In the period of 4 weeks, there was a statistical difference between the LHS and LS surfaces in relation to the MS surface. Statistical analysis of the NBA of the implants showed difference between the LHS and MS surface in the

period of 2 weeks. Thus, it is concluded that the addition of HA to the surface modified by laser can provoke a greater inflammatory response and that the experimental modifications LS and LHS favor the deposition of peri-implant bone tissue.

Keywords: Dental Implants. Wound healing. Surface. Nd-YAG lasers. Osseointegration

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 MEV/EDX: MS (250X, 500X, 1000X, 2500X e 5000X)	50
Fig. 2 MEV/EDX: SBAS (250X, 500X, 1000X, 2500X e 5000X)	51
Fig. 3 MEV/EDX: LS (250X, 500X, 1000X, 2500X e 5000X)	51
Fig. 4 MEV/EDX: LHS (250X, 500X, 1000X, 2500X e 5000X)	52
Fig. 5 Faloidina com fluorescência foi utilizada para a coloração de F-actina. As células foram observadas por microscópio confocal de varredura a laser. Barra de escala = 200µm. (A) superfície usinada - MS, (B) jateamento seguido de ataque ácido - SBAS, (C) superfície a laser - LS e (D) laser seguido de revestimento de HA - LHS	53
Fig. 6 Faloidina com fluorescência foi utilizada para a coloração de F-actina. As células foram observadas por microscópio confocal de varredura a laser. Barra de escala = 200µm. (A) superfície usinada - MS, (B) jateamento seguido de ataque ácido - SBAS, (C) superfície a laser - LS e (D) laser seguido de revestimento de HA - LHS	54
Fig. 7 Efeito mediado por HA na secreção de IL6 em MC3T3-E1. (A) valores de GAPDH e (B) expressão de IL6. A análise por RT-PCR foi realizada conforme descrito em materiais e métodos e os dados representam a expressão de IL6 usando MS como controle. (C) Imunoensaio mostrou que HA aumentou a expressão de IL6 em MC3T3-E1. Os dados representam os níveis de IL6 de experimentos individuais com a mediana. A análise estatística foi baseada em One-way ANOVA e os valores de p corrigidos foram indicados	55
Fig. 8 Efeito mediado por HA na secreção de IL6 em células ST2. (A) valores de GAPDH e (B) expressão de IL6. A análise por RT-PCR foi realizada conforme descrito em materiais e métodos e os dados representam a expressão de IL6 usando MS como controle. (C) O imunoensaio mostrou que HA aumentou a expressão de IL6 em células ST2. Os dados representam os níveis de IL6 de experimentos individuais com a mediana. A análise estatística foi baseada em One-way ANOVA e os valores de p corrigidos foram indicados	56

Fig. 9 Resultados Micro-CT- MS, SBAS, LS e LHS parâmetro BV/TV. Os dados 57
representam amostras individuais com a mediana e DP. Diferença
significante*, **, *** ($p < 0,05$) – Two-way ANOVA e teste de Tukey para
comparações múltiplas. * $p = 0,02$, ** $p = 0,0002$, *** $p = 0,003$.

Fig. 10 Resultados Micro-CT- MS, SBAS, LS e LHS - parâmetros Tb. N, Tb. 57
Sp e Tb.Th. Os dados representam amostras individuais com a mediana e DP.
Diferença significativa* ($p < 0,05$) – Two-way ANOVA e teste de Tukey para
comparações múltiplas. * $p = 0,01$.

Fig. 11 Resultados Micro-CT- MS, SBAS, LS e LHS - parâmetro Po.Tot. Os 58
dados representam amostras individuais com a mediana e DP. Diferença
significante** ($p < 0,05$) – Two-way ANOVA e teste de Tukey para comparações
múltiplas. ** $p = 0,001$.

Fig. 12 Imagens que representam a dinâmica da aposição mineral no tecido 59
observada em microscópio confocal a laser ($10 \times$) com fluorocromo de
calceína (corado em verde) e fluorocromo de alizarina (corado em vermelho).

Fig. 13 Gráfico representando as médias diárias do grupo de mineralização 60
óssea $p < 0,05$, representado por *, ** - Two-way ANOVA e teste de Tukey para
comparações múltiplas. * $p = 0,01$, ** $p = 0,001$. Os dados representam amostras
individuais com a mediana e DP.

Fig. 14 Fotomicrografias representativas de seções, coradas em azul de 61
Stevenel e fucsina ácida com ampliação de $1,6 \times$ (azul, tecido conjuntivo; rosa,
tecido mineralizado) - superfície MS, representando períodos de 2 (a-c) e 4 (d-
f) semanas, respectivamente

Fig. 15 Fotomicrografias representativas de seções, coradas em azul de 62
Stevenel e fucsina ácida com ampliação de $1,6 \times$ (azul, tecido conjuntivo; rosa,
tecido mineralizado) - superfície SBAS, representando períodos de 2 (a-c) e 4
(d-f) semanas, respectivamente

Fig. 16 Fotomicrografias representativas de seções, coradas em azul de 63
Stevenel e fucsina ácida com ampliação de $1,6 \times$ (azul, tecido conjuntivo; rosa,
tecido mineralizado) - superfície LS, representando períodos de 2 (a-c) e 4 (d-
f) semanas, respectivamente

Fig. 17 Fotomicrografias representativas de seções, coradas em azul de Stevenel e fucsina ácida com ampliação de 1,6 × (azul, tecido conjuntivo; rosa, tecido mineralizado) - superfície LHS, representando períodos de 2 (a-c) e 4 (d-f) semanas, respectivamente 64

Fig. 18 Cortes Histológicos não-descalcificados da região cortical superior (azul de Stevenel e fucsina ácida, aumento de 200x). MS, SBAS, LS e LHS nos períodos de 2 e 4 semanas, respectivamente 65

Fig. 19 Gráfico representando a porcentagem média por grupo da extensão linear entre osso mineralizado e implante (ELCOMI). Os dados representam amostras individuais com a mediana e DP. Diferença estatística $p < 0,05$, representado por *, **,*** - Two-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. * $p=0,04$, ** $p=0,0002$, *** $p<0,0001$. 66

Fig. 20 Gráfico representando a porcentagem média por grupo da área de osso neoformado. Os dados representam amostras individuais com a mediana e DP. Diferença estatística $p < 0,05$, representado por * - Two-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. * $p=0,03$. 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Viabilidade celular de células MC3T3-E1 e ST2	54
Tabela 2 Resultados Micro-CT- MS, SBAS, LS e LHS \pm desvio padrão (DP)	56
Tabela 3 Médias da taxa de mineralização óssea (MAR)	59
Tabela 4 Média e desvio padrão da extensão linear entre osso mineralizado e implante (ELCOMI)	66
Tabela 5 Média e desvio padrão da área óssea neoformada (AON)	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP	atividade da fosfatase alcalina
AON/NBA	área de tecido ósseo neoformado
BV/TV	porcentagem do volume ósseo
ELCOMI/BIC	extensão linear de contato entre o tecido ósseo mineralizado e a superfície do implante
HA	hidroxiapatita
IL-6	interleucina 6
LHS	superfície modificada por laser com recobrimento de HA método biomimético sem tratamento térmico
LS	superfície modificada por laser
MAR	taxa de aposição mineral
MC3T3-E1	linhagem celular osteogênica murina
MEV-EDX	Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada ao Sistema de Espectrometria de Energia Dispersiva de raios X
MICRO-CT	microtomografia computadorizada
MS	superfície usinada
OCN	osteocalcina
OPN	osteopontina
PGE2	prostaglandina E2
Po.tot	valor da porosidade total
RUNX2	fator de transcrição 2 relacionado ao runt
SBAS/SES	superfície modificada por jateamento seguido do condicionamento ácido disponível comercialmente
SFC ou SBF-	Simulated Body Fluid solução de fluido corpóreo
ST2	células estromais derivadas da medula óssea
Tb.N	número de trabéculas
Tb.Sp	separação de trabéculas
Tb.Th	espessura do trabeculado ósseo
Ti-cp	titânio comercialmente puro
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
YAG Laser	laser Itérbio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	32
2 PROPOSIÇÃO	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Superfícies Analisadas	38
3.2 Preparação das Superfícies Experimentais	38
3.2.1 Superfície modificada por feixe de laser (LS)	38
3.2.2 Superfície modificada por feixe de laser seguido da deposição de HA pelo método biomimético sem tratamento térmico (LHS)	39
3.3 Caracterização Topográfica das Superfícies	39
Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada ao Sistema de Espectrometria de Energia Dispersiva de raios X – MEV-EDX	39
3.4 Cultura de Células	39
3.4.1 Coloração de faloidina	40
3.4.2 Viabilidade celular	40
3.4.3 Análise qRT-PCR e Imunoensaio	40
3.4.4 Análise estatística	41
3.5 Estudo Experimental in Vivo de Implantes Instalados em Tíbia de Coelhos	41
3.5.1 Animais e Grupos Experimentais	41
3.5.2. Procedimento Cirúrgico	43
3.5.3 Anestesia	43
3.5.4 Acesso Cirúrgico	43
3.5.5 Osteotomia	44
3.5.6 Instalação dos Implantes	44
3.5.7 Sutura	44
3.5.8 Prescrição Pós-Operatória	45
3.5.9 Aplicação dos fluorocromos	45
3.5.10 Eutanásia e Coleta do Material	45
3.6 Forma de Análise dos Resultados	46
3.6.1 Análise Microtomográfica (Micro-Ct)	46
3.6.2 Preparação do material para análise de microscopia confocal a laser e histométrica	47

3.6.3 Microscopia confocal a laser	47
3.6.4 Análise Histométrica	48
3.6.5 Análise Estatística	48
4 RESULTADOS	50
4.1 Caracterização Topográfica das Superfícies	50
Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada ao Sistema de Espectrometria de Energia Dispersiva de raios X – MEV-EDX	50
4.2 Cultura de Células	52
4.2.1 Coloração de faloidina	52
4.2.2 Viabilidade celular	54
4.2.3 Análise qRT -PCR e Imunoensaio	55
4.3 Estudo Experimental in Vivo de Implantes Instalados em Tíbia de Coelhos	56
4.3.1 Análise Microtomográfica (Micro-Ct)	56
4.3.2 Microscopia confocal a laser	58
4.3.3 Análise Histológica e Histométrica	60
4.3.4 Análise estatística	66
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	87

Introdução

1 INTRODUÇÃO*

Quando se trata de reabilitação com implantes dentários é importante garantir, inicialmente, sua estabilidade no tecido ósseo. A estabilidade do implante dentário depende não só da técnica cirúrgica empregada, mas também das características macroscópicas e microscópicas do implante. No início dos anos 80, quando Bränemark apresentou ao mundo o conceito de osseointegração [1], os implantes utilizados eram de titânio liso e usinado, sem nenhuma modificação na superfície. Os implantes de titânio possuem a vantagem de ser biocompatíveis, apresentar resistência a corrosão e dureza adequada. Atualmente diversos estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de melhorar a resposta biológica, acelerando o processo de osseointegração e permitindo um contato maior entre o tecido ósseo e a superfície do implante.

Estes estudos e suas respectivas metodologias quase sempre estão relacionados à topografia de superfície [2–4], modificando fisicamente ou físico-quimicamente a superfície do implante, lançando mão de técnicas de subtração, como a modificação por condicionamento ácido, técnicas de adição, como recobrimento com hidroxiapatita (HA), e as técnicas mistas, que envolvem a técnica de subtração seguido da deposição de biomateriais [5–10].

Para que o processo de osseointegração ocorra é necessário que o sangue se espalhe pela superfície do implante instalado, atraindo proteínas para a superfície [11]. Esse processo é garantido pela molhabilidade do implante, ou seja, a superfície deve ser hidrofílica [12] para que o sangue se distribua com facilidade e uniformemente para todo o implante. Quanto menor o ângulo de contato das superfícies, melhor será o grau de molhabilidade. As modificações na superfície, além de proporcionar menor ângulo de contato, devem ser osteocondutoras para facilitar a atração e agregação celular sobre a rede de fibrina promovida pelo coágulo sanguíneo. Estudos prévios publicados utilizaram análise *in vitro* para avaliar a resposta biológica frente às modificações de superfície e foi observado que o processo de osteocondução favorece a agregação de algumas proteínas [13–16], as quais promoveram um aumento da migração e adesão celular, além de favorecer a

* Normalizado de acordo com o periódico Clinical Oral Investigations - <https://www.springer.com/journal/784/submission-guidelines>

proliferação e diferenciação celular sobre a superfície do implante [11]. Além disso, outros estudos prévios concluíram que a topografia dos implantes influenciou na regulação da resposta inflamatória e na atuação dos osteoblastos *in vitro*, que pode beneficiar os processos iniciais de reparo ósseo, reduzir a reabsorção e melhorar a adesão dos tecidos [11, 16–18].

O tratamento de superfície mais utilizado é o condicionamento ácido precedido ou não por jateamento. A técnica é realizada com o emprego de diferentes soluções, entre elas ácido clorídrico, sulfúrico, nítrico e fluorídrico em concentrações [3, 19] e tempos de exposição variados, sendo sua fórmula considerada como um segredo de indústria. Quando houver a associação prévia com o método de jateamento, este pode ser realizado por óxido de titânio, óxido de alumínio, areia, fosfato de cálcio entre outros, fazendo com que haja rugosidade na superfície, permitindo estabilização do coágulo [20–22]. Entretanto, vem sendo estudados outros métodos de modificação de superfície com resultados promissores, utilizando laser Itérbio (YAG Laser) [5, 6, 8, 9, 23–28]. A modificação da superfície pelo laser Itérbio pode ou não estar associado a deposição de biomateriais. Os primeiros relatos de deposição de biomateriais em superfícies de implantes foram pelo método de dispersão por plasma spray de HA [28]. No entanto, este método apresentava a desvantagem da possibilidade de ocorrência de trincas na interface mesmo após o processo de reparo, devido ao processo tardio de incorporação da HA pelo organismo, acarretando falha do implante [29]. Assim, novos métodos de deposição foram desenvolvidos. Entre eles o método biomimético que consiste na imersão do substrato a ser recoberto em solução sintética denominada solução de fluido corpóreo (SFC ou SBF- Simulated Body Fluid), que apresenta composição química e pH semelhantes ao plasma sanguíneo e temperatura similar à do corpo humano [30–34].

Deste modo, as modificações na superfície dos implantes possuem papel fundamental na modulação do processo de reparo, acelerando as fases iniciais do processo de osseointegração [10, 24, 35–40]. Este fato proporcionou um avanço da implantodontia, promovendo um maior nível de sucesso e segurança com o uso de implantes dentais, principalmente em condições desfavoráveis à osseointegração, como ossos de baixa qualidade [41] ou condições fisiológicas que acarretam comprometimento do reparo ósseo [42–45]. Neste sentido, as análises *in vitro* e *in vivo* do comportamento biológico frente às modificações de superfície são de extrema

relevância para validação das metodologias aplicadas em estudos de caracterização topográfica.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento biológico *in vitro* da linhagem celular osteogênica murina (MC3T3-E1) e de células estromais derivadas da medula óssea (ST2) mediante exposição às superfícies usinada (MS), modificada por jateamento seguido de condicionamento ácido, disponível comercialmente (SBAS), modificada por feixe de laser (LS) e modificada por feixe de laser com recobrimento de HA pelo método biomimético sem tratamento térmico (LHS). Após estudo *in vitro* realizou-se o estudo *in vivo* para identificar em condições fisiológicas e dentro da cronologia de reparação periimplantar o comportamento biológico do tecido ósseo ao redor de implantes instalados em tibia de coelhos diante das 4 superfícies citadas acima.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Superfícies Analisadas

Foram utilizados neste estudo implantes de titânio comercialmente puro (*Ti-cp*), grau IV com conexão de hexágono externo, e dimensões de 3.75x10mm (Titanium Fix, AS Technology, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) com 4 tipos diferentes de superfícies. Foram manufarados também discos de *Ti-cp*, empregados no estudo de caracterização topográfica das superfícies e estudo *in vitro*. As superfícies analisadas foram a usinada, a superfície modificada por jateamento seguido de condicionamento ácido disponível comercialmente (Titanium Fix, AS Technology, São José dos Campos, São Paulo, Brasil), e 2 superfícies experimentais modificadas no Grupo de Biomateriais do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista de Araraquara – UNESP. As superfícies analisadas foram:

(MS) – Superfície usinada;

(SBAS) - Superfície modificada por jateamento seguido de condicionamento ácido disponível comercialmente (Titanium Fix, AS Technology, São José dos Campos, São Paulo, Brasil)

(LS) – Superfície modificada por feixe de laser;

(LHS) – Superfície modificada por feixe de laser seguido da deposição de HA método biomimético sem tratamento térmico.

3.2 Preparação das Superfícies Experimentais

3.2.1 Superfície modificada por feixe de laser (LS)

Os implantes de *Ti-cp* com superfície usinada foram fixados em um torno rotativo, sob o equipamento de laser Yb: 20W pulsado (Pulsed itérbio Fiber Laser, Sistema OmniMark 20F, Ominitek Tecnologia Ltda, São Paulo, Brasil), com os parâmetros de 140mJ nominal de alimentação e frequência de pulso de 20 KHz. O feixe de laser foi projetado sobre toda a superfície dos implantes em temperatura ambiente, totalizando um período de 90min por amostra.

3.2.2 Superfície modificada por feixe de laser seguido da deposição de HA pelo método biomimético sem tratamento térmico (LHS)

Após irradiação da superfície por feixe de laser, as amostras foram imersas em 50 mL de solução de NaOH ($5,0 \text{ Mol.L}^{-1}$) na estufa por um período de 24 horas a 60°C , para a ativação da superfície, formando uma camada de titanato de sódio. Após a imersão em solução alcalina, as amostras foram mantidas na estufa por 3 horas, para secagem da superfície. Posteriormente, os implantes foram imersos em solução de fluido corpóreo (SFC) modificada [46], que simula os fluidos corpóreos por apresentar composição iônica e pH semelhantes aos do plasma sanguíneo. Os implantes permaneceram imersos nesta solução por um período de 4 dias, em estufa a 37°C e pH 7.25, para se obter um recobrimento composto por HA. A SFC foi trocada a cada 24 horas para que fosse mantida a quantidade de íons em solução.

3.3 Caracterização Topográfica das Superfícies

Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada ao Sistema de Espectrometria de Energia Dispersiva de raios X – MEV-EDX

A topografia da superfície das amostras foi analisada por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV ZEISS, modelo EVO LS15, equipado com detector de microanálise EDX da marca Oxford modelo Inca X-act, Alemanha), acoplado ao sistema de espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDX), para análise semi-quantitativa da composição química das superfícies [5, 6, 8, 9].

3.4 Cultura de Células

A linhagem celular osteogênica murina MC3T3-E1 foi gentilmente cedida por Oskar Hoffman (Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Universidade de Viena) e células estromais derivadas da medula óssea (ST2) foram isoladas da medula óssea de camundongos (RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japão) [47]. As células foram expandidas em meio de crescimento e semeadas a 5×10^5 células/cm² em placas de 24 poços e cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB;

Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Alemanha), 1% de antibióticos (PS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

3.4.1 Coloração de faloidina

As células foram semeadas nos discos e incubadas por 72h. Após a incubação, as células foram fixadas com formaldeído 4% em PBS por 20min, permeabilizadas com PBS contendo 0,1% TritonX-100 por 5min e então incubadas em faloidina (Phalloidin CruzFluor™ conjugados, 1:1000 em DMSO e 1% BSA) por 90min à temperatura ambiente no escuro. Finalmente, os discos foram lavados e montados em lâminas de vidro. As imagens foram capturadas em um microscópio fluorescente (Echo Revolve MTEL2LL/A, 2019, San Diego, CA 92126 acoplado ao software Echo system versão 13.4) [47, 48].

3.4.2 Viabilidade celular

As células foram incubadas nos discos em placas de 48 poços (CytoOne, Starlab International, Hamburgo, Alemanha). Após 72h, uma concentração final de 0,5 mg/mL de uma solução de brometo de MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio – (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado a cada poço da placa de microtitulação por 2h a 37°C. Após a remoção do meio, os cristais de formazan foram solubilizados com dimetil sulfóxido (DMSO). A avaliação da densidade óptica foi realizada para 570 nm e expressa como porcentagem da superfície do MS.

3.4.3 Análise qRT-PCR e Imunoensaio

O RNA total foi isolado com o kit ExtractMe total RNA (Blirt S.A., Gdańsk, Polônia). Após a extração do RNA, para análise quantitativa, foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo scientific) para medir a concentração de RNA medida em ng/uL. A transcrição reversa (TR) foi realizada com o Kit LabQ FirstStrand cDNA Synthesis (LabQ, Labconsulting, Viena, Áustria). A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) foi realizada (LabQ,

Labconsulting, Viena, Áustria) em um Sistema de Detecção de PCR em Tempo Real CFX Connect™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). As sequências de primer para IL6 são gctaccaaactggatataatcagga (direto) e ccaggtagctatggactccagaa (reverso). Os níveis de mRNA foram calculados normalizando para os genes de manutenção GAPDH (aactttggcattgtggaagg – direto; ggatgcagggatgatgttct-reverso) usando o método $\Delta\Delta Ct$. O imunoenensaio foi feito com o kit mouse IL6 Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

3.4.4 Análise estatística

Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes. Os gráficos de pontos mostram os dados de todos os experimentos independentes com mediana. A análise estatística foi baseada em One-way ANOVA com correção para comparações múltiplas. As análises foram realizadas usando Prism v9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). A significância foi estabelecida em $p < 0,05$.

3.5 Estudo Experimental *in Vivo* de Implantes Instalados em Tíbia de Coelhos

3.5.1 Animais e Grupos Experimentais

Para a realização deste trabalho foram utilizados 20 (Vinte) coelhos machos, adultos, variação *Albinus*, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, com aproximadamente 5 (cinco) meses de idade, peso em torno de 3.1 a 4.3 Kg, mantidos em gaiolas unitárias, ambiente climatizado, alimentados com ração sólida (Ração Procoelho, Primor) e água *ad libitum*, durante todo o experimento. Para determinação do poder da amostra foi considerado um nível de significância de 5% (com desvio padrão de 2%), e com um poder de teste de 80%, sendo definindo alpha como 0,05 e cinco coelhos por grupo foram necessários para a finalidade de comparar os diferentes grupos.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade

de Odontologia de Araçatuba – UNESP, protocolo nº 00554-2018. O projeto foi delineado de acordo com as diretrizes da ARRIVE guidelines [49].

Os mesmos animais foram enquadrados em quatro grupos experimentais:

1- Grupo Usinado (MS) - Os animais tiveram implantes de 3,75mm de diâmetro e 10 mm de comprimento de superfície usinada (AS Technology, TitaniumFix, São Paulo, Brasil) instalados aleatoriamente em osteotomia realizada na região medial da face lateral da tíbia após fresagem padronizada para implantodontia com 3,0 mm de diâmetro e 10 de profundidade.

2- Grupo Jateamento e Condicionamento Ácido (SBAS) - Os animais tiveram implantes de 3,75mm de diâmetro e 10 mm de comprimento de superfície modificada por jateamento seguido do condicionamento ácido, superfície disponível comercialmente (AS Technology, TitaniumFix, São Paulo, Brasil) instalados aleatoriamente em osteotomia realizada na região medial da face lateral da tíbia após fresagem padronizada para implantodontia com 3,0 mm de diâmetro e 10 de profundidade.

3- Grupo laser (LS) - Os animais tiveram implantes de 3,75mm de diâmetro e 10 mm de comprimento de superfície modificada por laser instalados aleatoriamente em osteotomia realizada na região medial da face lateral da tíbia após fresagem padronizada para implantodontia com 3,0 mm de diâmetro e 10 de profundidade.

4- Grupo laser recoberto por HA método biomimético sem tratamento térmico (LHS) - Os animais tiveram implantes de 3,75mm de diâmetro e 10 mm de comprimento de superfície modificada por laser com HA pelo método biomimético sem tratamento térmico instalados aleatoriamente em osteotomia realizada na região medial da face lateral da tíbia após fresagem padronizada para implantodontia com 3,0 mm de diâmetro e 10 de profundidade.

Os animais foram enquadrados em 2 períodos de avaliação: 2 e 4 semanas, compondo 10 animais por período, e 5 implantes de cada superfície em cada período que foram usados nas análises microtomográfica e histométrica.

3.5.2. Procedimento Cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados conforme descrito em trabalhos prévios publicados [5–9, 40].

3.5.3 Anestesia

Os animais foram mantidos em jejum oito horas antes do procedimento cirúrgico. Para todos os procedimentos cirúrgicos foi realizada anestesia geral por infiltração intramuscular de 50mg/kg de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil), além da complementação anestésica na região a ser operada com a infiltração de 0.3 ml/Kg Cloridrato de mepivacaína (Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França).

3.5.4 Acesso Cirúrgico

A região anterior das tíbias direita e esquerda foram tricotomizadas e posteriormente foi realizada a antisepsia pré-operatória com Polivinil Pirrolidona Iodo degermante (PVP-I 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico. O acesso cirúrgico foi realizado por meio de uma incisão dermo-periosteal empregando-se uma lâmina de bisturi n°.15 (Feather, Feather Safety, Japan) montada em cabo de bisturi n°.3 (Hu-Friedy, German) na margem anterior da tíbia, iniciada a um centímetro abaixo da articulação tíbio-femural, medindo aproximadamente 6 (seis) centímetros de comprimento (Anexo B1a). Após incisão, o retalho foi deslocado, com consequente exposição proximal da face lateral da tíbia, local de eleição para a osteotomia (Anexo B1b).

3.5.5 Osteotomia

Após a exposição medial da face lateral da tíbia realizou-se osteotomia de 3,0mm de diâmetro e 10mm de comprimento em região distal do ligamento tibio-femural. O preparo do leito receptor do implante iniciou-se com a broca em forma de lança, para romper a cortical óssea (Anexo B1c). Em seguida foram utilizadas as fresas de 2.0mm, piloto de 2,0/3,0mm e fresa de 3.0mm (AS Techonology, Titaniumfix, São Paulo, Brasil), montadas em contra ângulo redutor 20:1 (Kavo do Brasil, Joinville, Brasil), acoplado em motor elétrico (Kavo do Brasil, Joinville, Brasil), a uma velocidade de 1600 rpm, sob irrigação constante de solução fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil).

3.5.6 Instalação dos Implantes

Os implantes foram instalados por meio de chave motor de torque interno para conexão de hexágono externo (AS Techonology, Titaniumfix, São Paulo, Brasil) que foi encaixada no módulo de rebordo do implante, montada em contra ângulo redutor 20:1 acoplado ao motor elétrico numa velocidade de 18 rpm, e sob irrigação constante de solução fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil). Foi instalado um implante de cada superfície em cada tíbia de animal (Anexo B1d,e,f,g). O implante foi inserido até que o módulo de rebordo assentou na camada cortical externa da região distal da face lateral da tíbia. Após instalação do implante foi colocado o parafuso de cobertura para proteção do módulo de rebordo (Anexo B1h).

3.5.7 Sutura

O tecido mole foi reposicionado e suturado por planos. A sutura muscular foi realizada com fio absorvível de Poligalactina 910 (Vicryl 5.0, Ethicon, Jhonson, São José dos Campos, Brasil). No plano cutâneo a sutura foi realizada com fio de nylon 5.0 (Ethicon, Jhonson, São José dos Campos, Brasil). Após a sutura, realizou-se novamente realizada a antissepsia da área com Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico (PVP-I 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto) (Anexo B1i).

3.5.8 Prescrição Pós-Operatória

No pós-cirúrgico foi administrado via oral diluído em água 3mg/kg de Cetoprofeno (Cetoprofeno, Sanofi, São Paulo, Brasil) associado a 5mg/kg de Cloridrato de Tramadol (Cronidor, Agener União Química, São Paulo, Brasil) durante 3 (três) dias. Foi administrado também por via intramuscular 10 mg/kg de Enrofloxacina (Enrofloxacino, Venco, Londrina, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de Doxiciclina (Doxiciclina, Venco - Londrina, Brasil) durante 7 (sete) dias.

3.5.9 Aplicação dos fluorocromos

Nesta metodologia de cortes calcificados foram empregados apenas os 10 animais do período de 4 semanas, uma vez que nos animais pertencentes ao período de eutanásia de 2 semanas não houve tempo hábil para a aplicação dos fluorocromos empregados neste trabalho. A aplicação dos fluorocromos foi de acordo com a metodologia empregada em estudos prévios publicados [50–52]. Para análise de epifluorescência, no período de 15 dias após a instalação dos implantes foi administrado pela via intramuscular 20 mg/kg de calceína. Passados mais 25 dias da instalação dos implantes, foi administrado 30 mg/kg de vermelho de alizarina para cada animal.

3.5.10 Eutanásia e Coleta do Material

Nos períodos de 2 e 4 semanas os animais agrupados em número de 10 por período, 5 por grupo experimental foram mantidos em jejum por oito horas antes do procedimento de eutanásia. Para tal foi realizada sedação por infiltração intramuscular de 50mg/kg de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil), além da complementação por anestesia local nas tíbias, com a infiltração de 0.3 ml/Kg de Cloridrato de Mepivacaína (Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França). Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de perfusão no ventrículo esquerdo de solução salina fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 (dez) minutos, seguido da perfusão de paraformaldeído 4% por 40 (quarenta) minutos

por meio de bomba perfusora peristáltica (Masterflex® Ls, Cole – Parmer Instrument Company). Após eutanásia, as tíbias direita e esquerda foram removidas, o tecido mole excedente eliminado, e a pós-fixação foi realizada em solução de paraformaldeído 4% a 4°C, durante um período de 6 horas. Os implantes foram avaliados pela análise microtomográfica, e, em seguida, foram levados à inclusão em resina Technovit, para processamento dos cortes calcificados através de micrótomo específico (Exakt).

3.6 Forma de Análise dos Resultados

3.6.1 Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

Após a eutanásia dos animais, as tíbias direita e esquerda, foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 24 horas, seguidos de banho em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram armazenadas em álcool 70%, para a realização da análise microtomográfica. A análise microtomográfica foi realizada de acordo com metodologia descrita por trabalho prévio publicado [53]. Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) as peças foram escaneadas utilizando cortes de 6µm de espessura (90Kv e 111µA) com filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0.5mm, tamanho do pixel de 2016x1344 µm e com tempo de aquisição médio de 2h e 50min. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas, determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.10.2), com smoothing de 1, correção dos anéis de artefato de 20, correção de Beam Hardening de 0% e a faixa de conversão de imagem poderá variar de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.5.2 64-bit), as imagens foram reconstruídas para serem observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.15.4.0) foi avaliado e mensurado [46] a porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (Tb.Sp e Tb.N), valor da porosidade total (Po.tot) e reconstrução em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

3.6.2 *Preparação do material para análise de microscopia confocal a laser e histométrica*

Após análise microtomográfica as tibias direita e esquerda, contendo os implantes localizados mais distais a articulação tibio-femural foram novamente colocadas em formalina neutra tamponada a 10% por um período de 72h. Em seguida foi realizada a desidratação dessas peças em concentrações crescentes de álcoois (etanol 60-100%) e posteriormente, infiltração em resina fotopolimerizável (Technovit 7200 VLC, Kultzer Heraeus GmbH & Co., Wehrheim, Alemanha). Os blocos contendo implante e tecido ósseo peri-implantar foram cortados em um ponto central, empregando-se um micrótomo com sistema de corte e desgaste (Exakt Apparatebau, Hamburgo, Alemanha). As lâminas obtidas apresentaram espessura de aproximadamente 50 μm .

3.6.3 *Microscopia confocal a laser*

Nas lâminas obtidas das tibias dos 10 animais pertencentes ao período de eutanásia de 4 semanas em todos os quatro grupos experimentais foram capturados pelo microscópio a laser confocal Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando uma objetiva de 10X (original aumentar 100) na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara. Foram obtidas assim, imagens dos fluorocromos calceína e vermelho de alizarina separadamente (osso velho/osso novo) e por fim, estas imagens foram reconstruídas, fornecendo a sobreposição dos fluorocromos utilizados para avaliação do turnover ósseo pela taxa de aposição mineral (MAR).

As imagens foram transportadas para o programa computacional analisador de imagens Image J (Software de Processamento e Análise de Imagem, Ontario, ON, Canadá). Através da ferramenta “free hands”, a área de precipitação dos fluorocromos (calceína/alizarina) foi mensurada. Na análise da aposição óssea mineral, a partir da ferramenta straight foram traçadas 5 medidas estendendo-se da margem externa da calceína em direção a margem externa da alizarina, sendo o valor obtido, dividido por 10, que representa o intervalo de dias entre as injeções dos dois fluorocromos analisados [54].

3.6.4 Análise Histométrica

Todas as lâminas contendo os implantes em tecido calcificado dos quatro grupos experimentais nos períodos de 2 e 4 semanas foram coradas pelo azul de Estevenel e fucsina ácida. As imagens foram analisadas em microscópio óptico (Diastar, Leica Reichert & Jung products, Alemanha) e capturadas por meio de uma câmera fotográfica digital (Leica Microsystems DFC-300-FX, Alemanha), com resolução de 1.3 megapixels, acoplada ao microscópio de luz.

As análises histométricas foram realizadas por meio do software de análise de imagens ImageJ. Foram calculadas, em porcentagem, a extensão linear de contato entre o tecido ósseo mineralizado e a superfície do implante (*ELCOMI*) e a área de tecido ósseo presente (*AON*) entre as 3 espiras mais coronárias, localizadas em osso cortical em cada lado do implante [7–9].

3.6.5 Análise Estatística

Os valores obtidos nas análises microtomográfica, microscopia confocal a laser (MAR) e histométrica (*ELCOMI* e *AON*) foram tabulados e levados ao teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi baseada em One-way ANOVA para MAR e Two-way ANOVA para as análises microtomográfica e histométrica (*ELCOMI* e *AON*), com correção para comparações múltiplas. As análises foram realizadas usando Prism v9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). A significância foi estabelecida em $p < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização Topográfica das Superfícies

Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada ao Sistema de Espectrometria de Energia Dispersiva de raios X – MEV-EDX

MS apresentou topografia de superfície lisa, contaminadas com restos de usinagem (Figura 1a,b,c), enquanto SBAS apresentou uma superfície com crateras, característico do processo de subtração (Figura 2a,b,c). LS (Figura 3a,b,c), e LHS (Figura 4a,b,c) produziram superfícies rugosas com padrão morfológico mais regular e homogêneo, semelhantes a favo de mel. A análise por EDX não revelou qualquer contaminação das superfícies analisadas, e mostrou picos de Ti para a MS (Figura 1d) e Ti e O para SBAS (Figura 2d). Para a LS, observaram-se picos de Ti e altos picos de O (Figura 3d). Entretanto a LHS revelou a presença de picos de Ti, O, Ca e Na (Figura 4d).

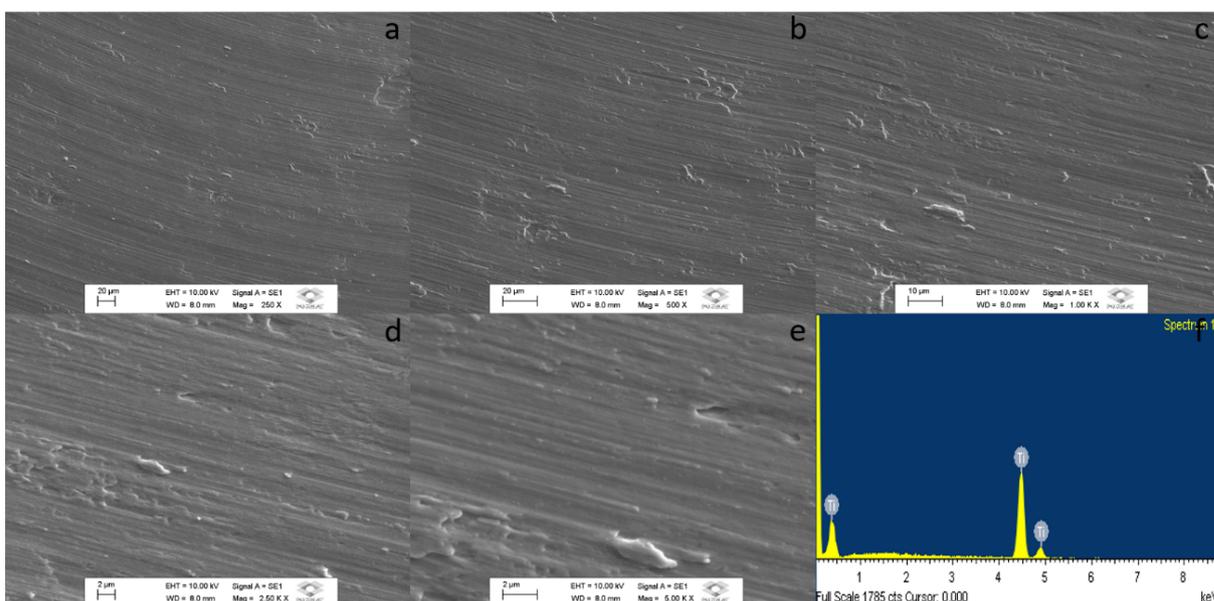


Fig. 1 a, b, c, d, e – MEV: MS (250X, 500X, 1000X, 2500X e 5000X). f – EDX MS

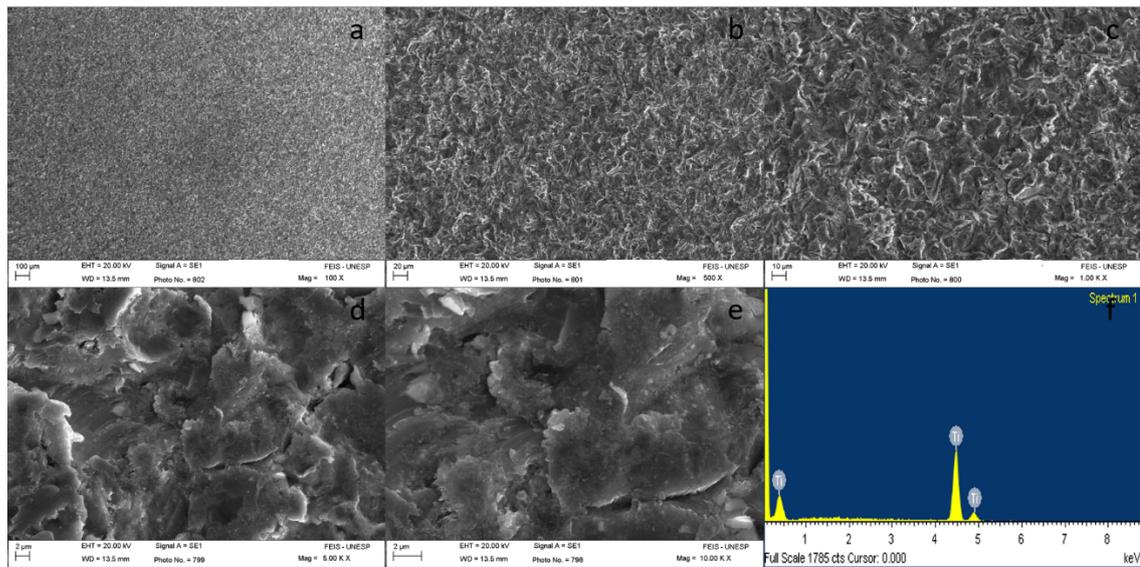


Fig. 2 a, b, c, d, e – MEV: SBAS (250X, 500X, 1000X, 2500X e 5000X). f – EDX SBAS

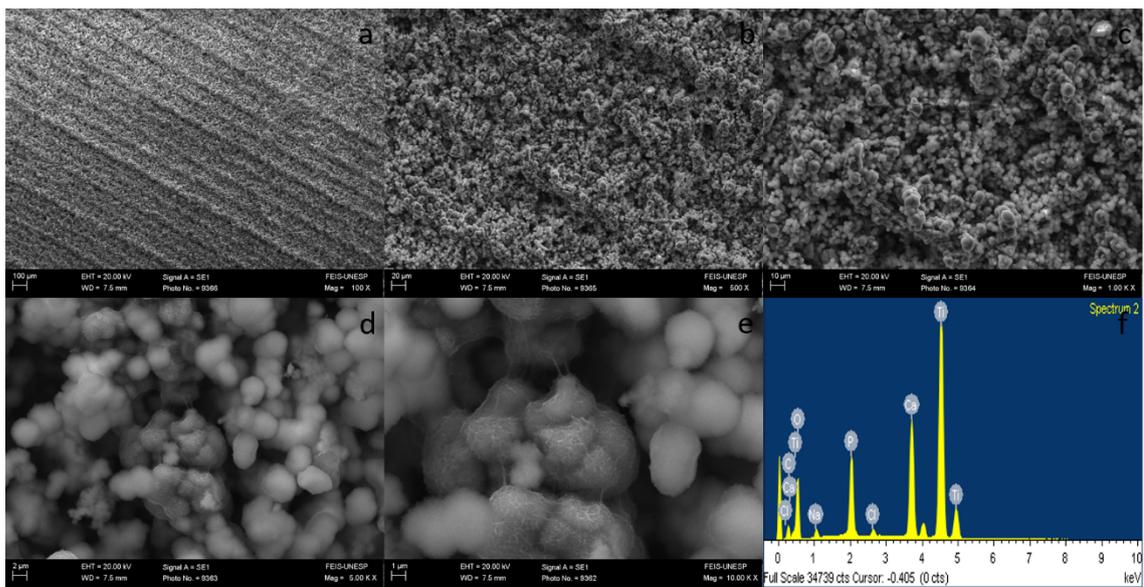


Fig. 3 a, b, c, d, e – MEV: LS (100X, 500X, 1000X, 5000X e 10000X). f – EDX LS

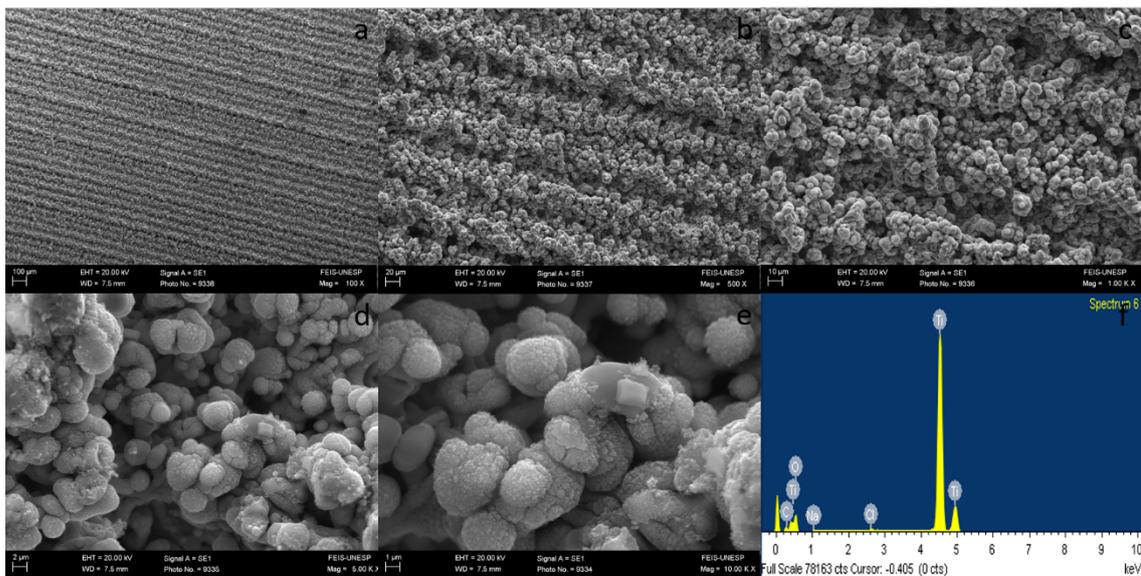


Fig. 4 a, b, c, d, e – MEV: LHS (100X, 500X, 1000X, 5000X e 10000X). **f** – EDX LHS

4.2 Cultura de Células

4.2.1 Coloração de faloidina

Para a avaliação da morfologia celular através dos filamentos de actina nas células fixadas nas superfícies dos discos, foi realizada a coloração de faloidina. Em superfícies mais lisas, como MS e SBAS (Fig. 5a,b), observou-se maior número de células, mantendo sua morfologia original com longos filamentos de actina. Em relação a LS e LHS (Fig. 5c,d), há uma redução significativa no número de células, o que pode estar relacionado à rugosidade da superfície, uma vez que o padrão de rugosidade de ambas as superfícies experimentais é homogêneo e regular, com presença de vales mais profundos, as células podem estar presentes em diferentes camadas das superfícies. No entanto, no LHS há uma diferença morfológica nas células, o que sugere que a HA pode ter um certo grau de toxicidade em MC3T3-E1.

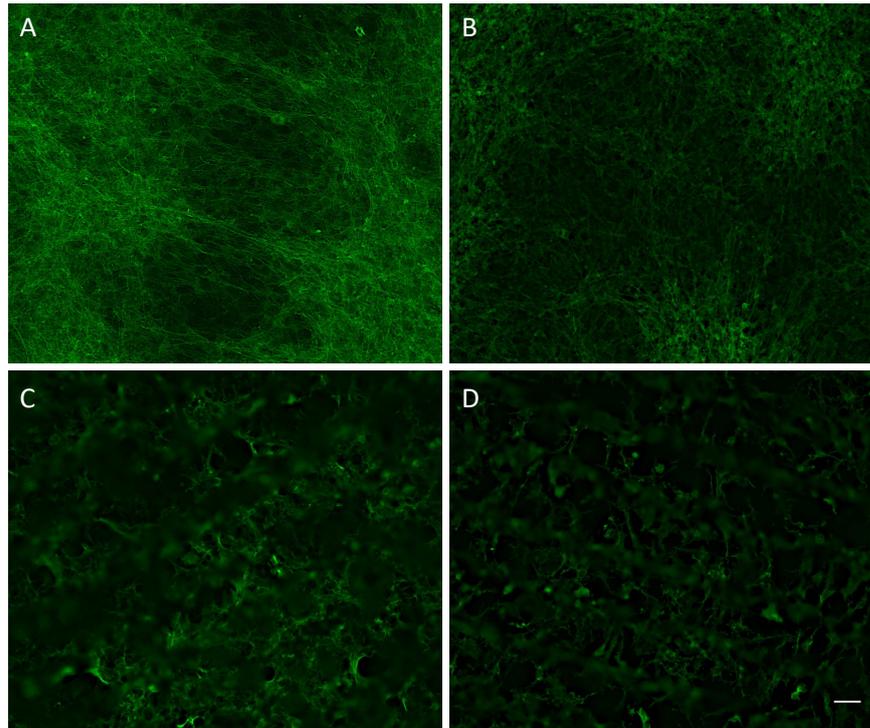


Fig. 5 Faloidina com fluorescência foi utilizada para a coloração de F-actina. As células foram observadas por microscópio confocal de varredura a laser. Barra de escala = 200 μ m. (A) superfície usinada - MS, (B) jateamento seguido de ataque ácido - SBAS, (C) superfície a laser - LS e (D) laser seguido de revestimento de HA - LHS

Em seguida, confirmou-se os efeitos do HA usando células ST2. Consistentemente, em superfícies mais lisas como MS e SBAS, observou-se maior número de células, mantendo sua morfologia original, com longos filamentos de actina, assim como LS (Fig. 6a,b,c). Em relação ao LHS, foram observados os mesmos resultados presentes em MC3T3-E1, com redução do número de células e alteração da morfologia (Fig. 6d). Esses resultados fornecem fortes evidências de que a HA pode ter um certo grau de toxicidade nas células ST2.

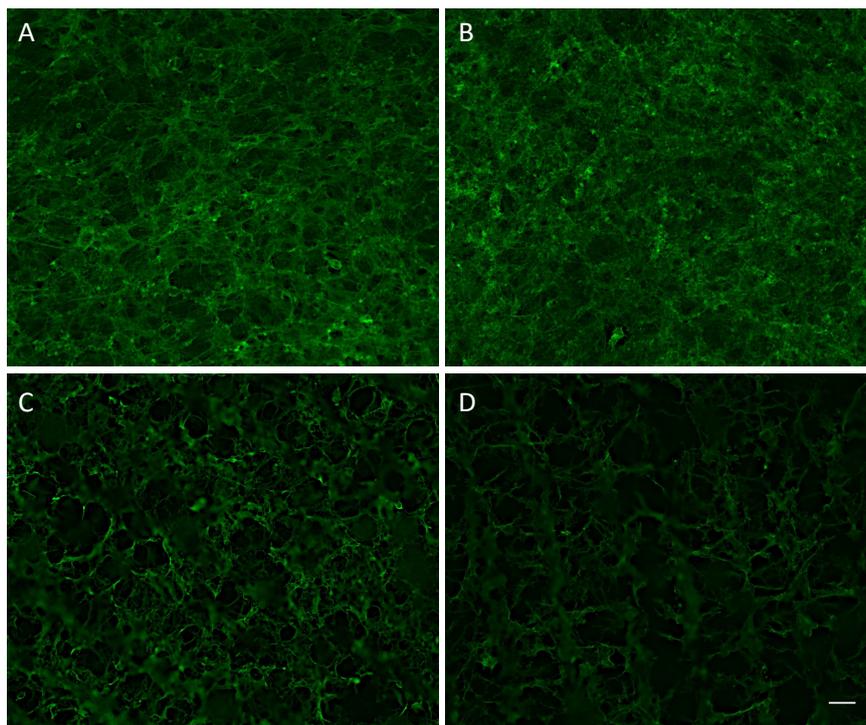


Fig. 6 Faloidina com fluorescência foi utilizada para a coloração de F-actina. As células foram observadas por microscópio confocal de varredura a laser. Barra de escala = 200 μ m. (A) superfície usinada - MS, (B) jateamento seguido de ataque ácido - SBAS, (C) superfície a laser - LS e (D) laser seguido de revestimento de HA - LHS

4.2.2 Viabilidade celular

Para expandir a avaliação do impacto da viabilidade celular HA foi realizado um ensaio MTT. Os dados obtidos foram inseridos na Tabela 1, na qual se observa a redução da viabilidade celular nas superfícies LS e LHS, mais precisamente em LHS.

Tabela 1 Viabilidade celular de células MC3T3-E1 e ST2.

Tipo celular /superfícies	MC3T3-E1		ST2	
SBAS	176.8	90.2	140.8	103.5
LS	109.3	81.1	78.5	144.1
LHS	83.0	56.4	61.0	46.1

Tabela 1. A viabilidade celular é representada pela produção de formazan indicada em porcentagem de MS como controle.

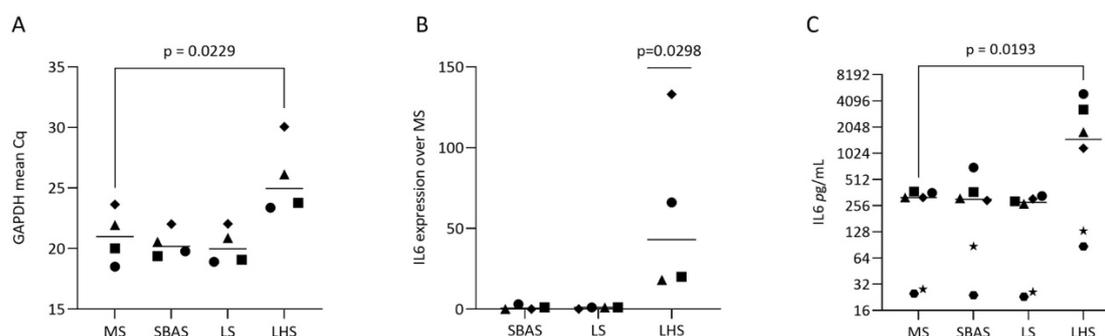


Fig. 8 Efeito mediado por HA na secreção de IL6 em células ST2. (A) valores de GAPDH e (B) expressão de IL6. A análise por RT-PCR foi realizada conforme descrito em materiais e métodos e os dados representam a expressão de IL6 usando MS como controle. (C) O imunoenensaio mostrou que HA aumentou a expressão de IL6 em células ST2. Os dados representam os níveis de IL6 de experimentos individuais com a mediana. A análise estatística foi baseada em One-way ANOVA e os valores de p corrigidos foram indicados.

4.3 Estudo Experimental *in Vivo* de Implantes Instalados em Tíbia de Coelhos

4.3.1 Análise Microtomográfica (Micro-CT)

Foram avaliados 5 parâmetros: porcentagem de volume ósseo (BV/TV), número, separação e espessura de trabéculas (Tb.N, Tb.Sp e Tb.Th, respectivamente) e valor da porosidade total (Po.Tot). Os dados das médias e desvios padrão dos 5 parâmetros foram apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados Micro-CT- MS, SBAS, LS e LHS \pm desvio padrão (DP).

Grupos	BV/TV		Tb. N		Tb. Th		Tb. Sp		Po. Tot	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
MS 2	88,7	2,53	4,7	0,55	0,17	0,028	0,066	0,027	6,8	2,53
SBAS 2	90,2	0,61	5,3	0,18	0,16	0,004	0,083	0,012	9,7	0,61
LS 2	93,0	0,55	4,8	0,11	0,19	0,005	0,068	0,007	6,9	0,55
LHS 2	95,5	3,14	4,8	0,17	0,19	0,013	0,058	0,012	4,4	3,14
MS 4	95,0	0,73	6,1	1,67	0,16	0,043	0,061	0,019	4,9	0,73
SBAS 4	93,6	2,87	4,9	0,11	0,19	0,010	0,054	0,003	5,1	1,43
LS 4	93,1	1,53	4,6	0,05	0,19	0,009	0,064	0,001	6,8	1,53
LHS 4	94,3	1,36	5,1	0,29	0,18	0,007	0,084	0,030	5,6	1,36

Tabela 2. Média dos valores dos parâmetros obtidos na Micro-CT: BV/TV, Tb. N, Tb.Th, Tb.Sp e Po.Tot. Nível de significância ($p < 0,05$) - Two-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas.

Os valores obtidos na porcentagem de volume ósseo mostraram-se mais heterogêneos, obtendo-se diferença estatisticamente significativa entre a superfície

MS ($88,7 \pm 2,53$) e as superfícies LS ($93,0 \pm 0,55$) e, e entre a LHS ($95,5 \pm 3,14$) e a superfície SBAS ($90,2 \pm 0,61$), no período de 2 semanas (Figura 9). Não houve diferença estatística significativa entre as superfícies no período de 4 semanas.

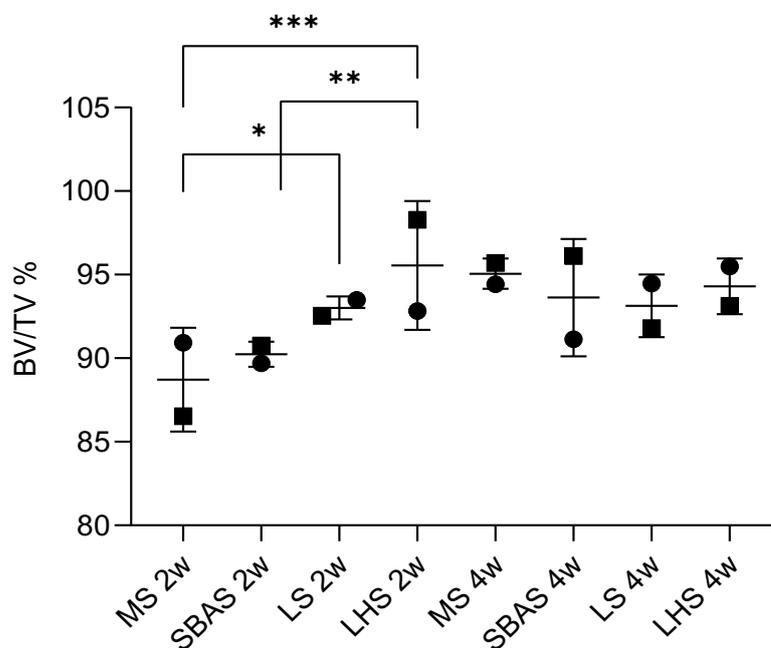


Fig. 9 Resultados Micro-CT- MS, SBAS, LS e LHS parâmetro BV/TV. Os dados representam amostras individuais com a mediana e DP. Diferença significativa *, **, *** ($p < 0,05$) – Two-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. * $p = 0,02$, ** $p = 0,0002$, *** $p = 0,003$.

No parâmetro Tb. N, houve diferença estatística apenas entre a superfície MS ($6,1 \pm 1,67$) e a superfície LS ($4,6 \pm 0,05$) no período de 4 semanas (Figura 10a). Em relação aos parâmetros Tb.Sp (Figura 10b) e Tb.Th (Figura 10c) não houve diferença estatística entre as superfícies.

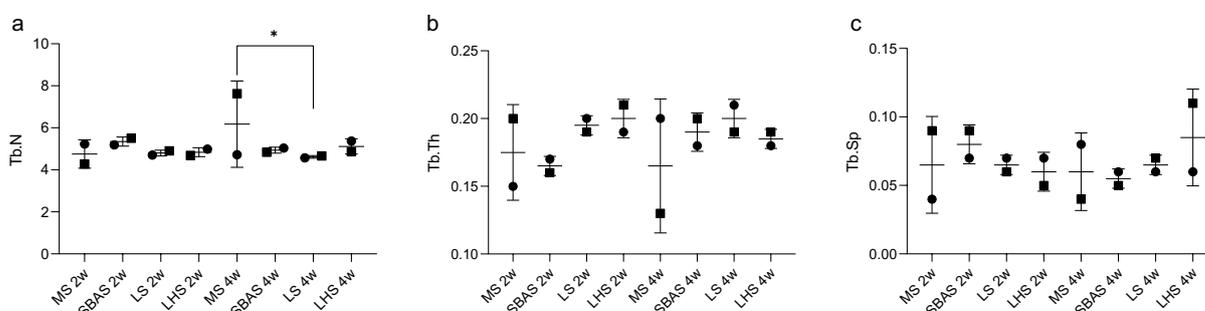


Fig. 10 Resultados Micro-CT- MS, SBAS, LS e LHS - parâmetros Tb. N, Tb. Sp e Tb.Th. Os dados representam amostras individuais com a mediana e DP. Diferença significativa* ($p < 0,05$) – Two-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. * $p = 0,01$.

Em relação à porosidade total (Po.Tot), houve diferença estatística apenas entre as superfícies SBAS ($9,7 \pm 0,61$) e LHS ($4,4 \pm 3,14$), no período de 2 semanas (Figura 11).

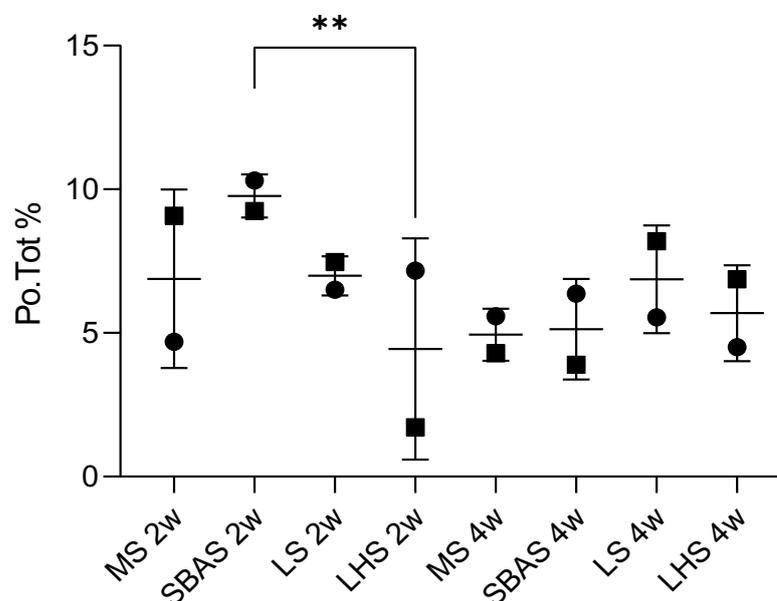


Fig. 11 Resultados Micro-CT- MS, SBAS, LS e LHS - parâmetro Po.Tot. Os dados representam amostras individuais com a mediana e DP. Diferença significativa** ($p < 0,05$) – Two-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. ** $p = 0,001$.

4.3.2 Microscopia confocal a laser

As imagens obtidas por microscopia confocal a laser estão representadas na figura 12, onde estão representadas as superfícies nas colunas e as marcações dos fluorocromos nas linhas, sendo Alizarina, Calceína e sobreposição de ambos os fluorocromos, respectivamente.

Observou-se que houve uma maior marcação da alizarina na superfície LHS, mostrando que houve uma dinâmica maior de tecido neoformado entre as espiras do implante, quando comparado às outras superfícies.

Nas imagens com a sobreposição dos fluorocromos, observou-se que as linhas de margem entre a alizarina e calceína encontram-se mais definidas, espessas e regulares e concentradas entre as duas primeiras roscas do implante nas superfícies experimentais LS e LHS quando comparadas ao padrão obtido em MS e SBAS, onde as linhas de margem encontram-se mais distribuídas entre as 3 primeiras roscas, e

mais longe uma das outras.

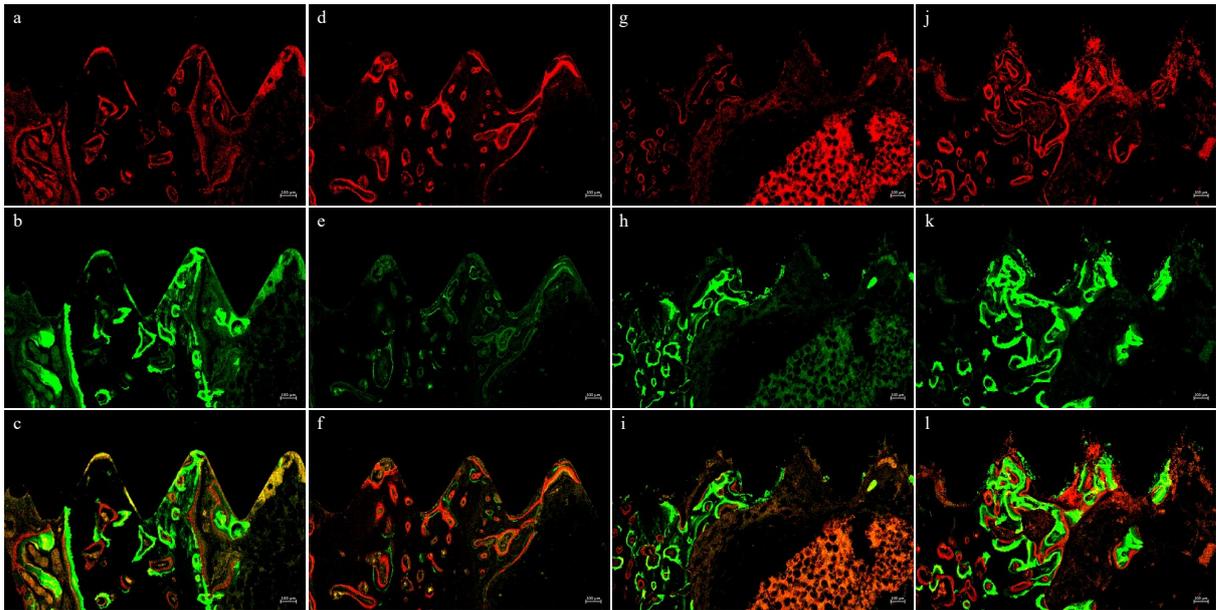


Fig. 12 Imagens que representam a dinâmica da aposição mineral no tecido observada em microscópio confocal a laser (10 ×) com fluorocromo de calceína (corado em verde) e fluorocromo de alizarina (corado em vermelho).

Os dados obtidos na análise da taxa de mineralização óssea (MAR) foram anotados, tabulados e submetidos à análise estatística. As médias e desvio padrão estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 Médias da taxa de mineralização óssea (MAR).

Grupo	Média	DP
MS	1,092	0,301
SBAS	1,225	0,152
LS	1,546	0,172
LHS	1,685	0,205

Tabela 3. Nível de significância ($p < 0,05$) - One-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas.

Houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies MS e as superfícies LS e LHS (Figura 13), mostrando que houve uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado nas superfícies tratadas.

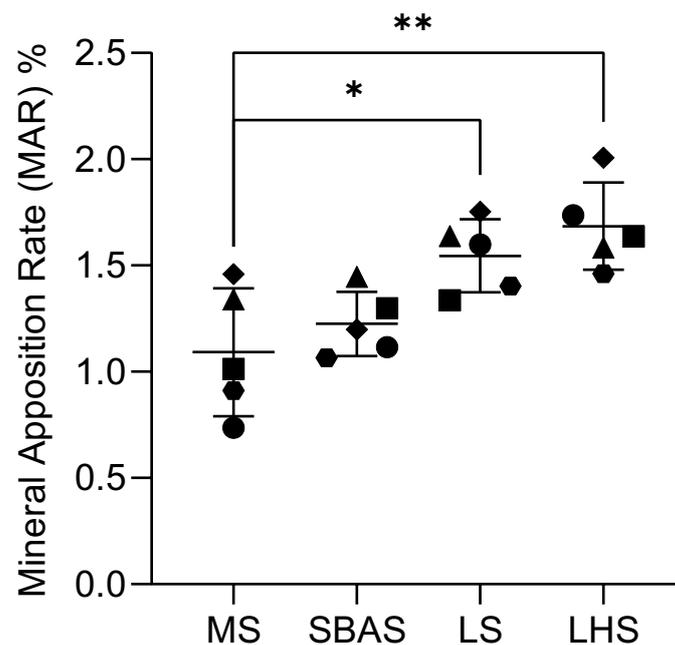


Fig. 13 Gráfico representando as médias diárias do grupo de mineralização óssea $p < 0,05$, representado por *, ** - One-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. * $p=0,01$, ** $p=0,001$. Os dados representam amostras individuais com a mediana e DP.

4.3.3 Análise Histológica e Histométrica

No período de 2 semanas, observa-se um padrão semelhante entre as superfícies MS (Figura 14a,b,c) e SBAS (Figura 15a,b,c), nas quais o tecido ósseo encontra-se bem distribuído entre as 3 primeiras roscas do implante, porém, com baixo contato osso/implante. No período de 4 semanas, tanto em MS (Figura 14d,e,f) quanto em SBAS (Figura 15d,e,f), observa-se uma migração do tecido ósseo, o qual encontra-se mais compacto e maduro, concentrado nas duas primeiras roscas do implante, com a presença de algumas áreas de tecido conjuntivo imaturo entre as trabéculas ósseas.

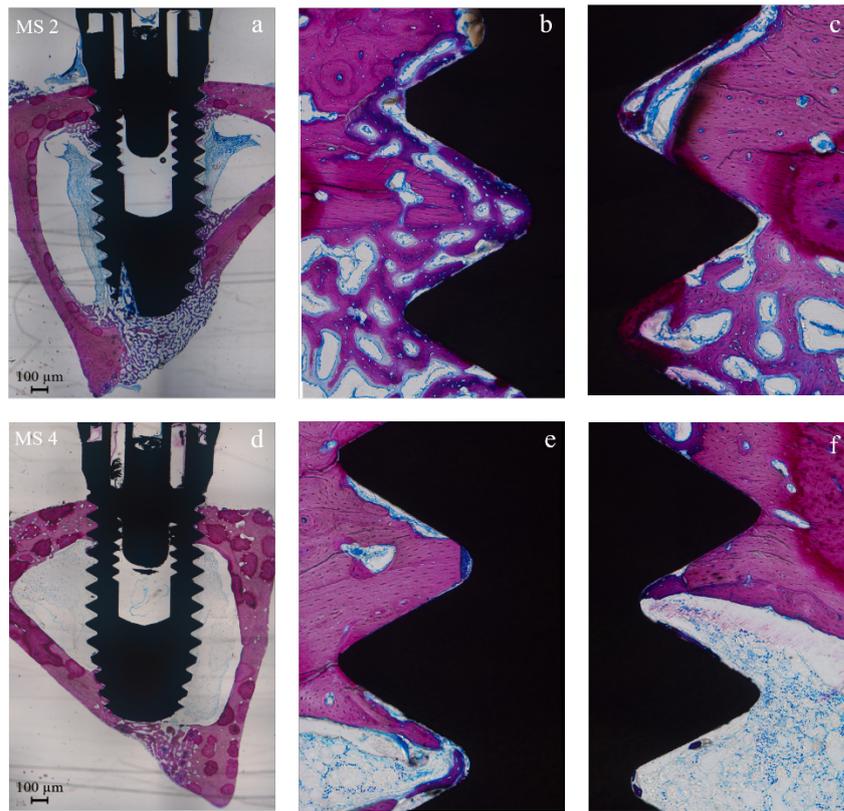


Fig. 14 Fotomicrografias representativas de seções, coradas em azul de Estevenel e fucsina ácida com ampliação de $1,6 \times$ (azul, tecido conjuntivo; rosa, tecido mineralizado) - superfície MS, representando períodos de 2 (a-c) e 4 (d-f) semanas, respectivamente

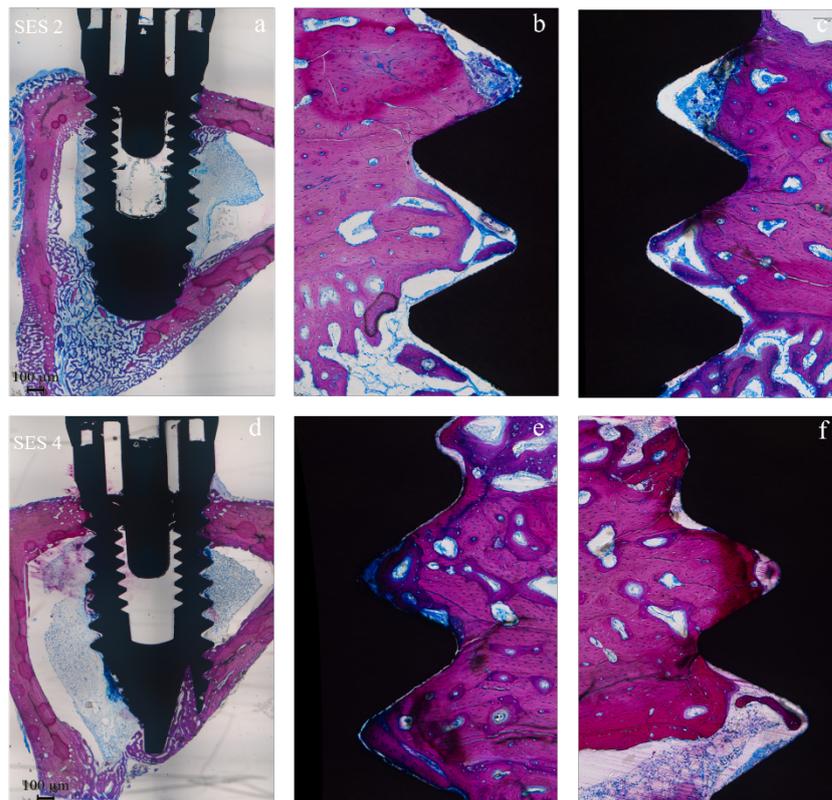


Fig. 15 Fotomicrografias representativas de seções, coradas em azul de Estevenel e fucsina ácida com ampliação de $1,6 \times$ (azul, tecido conjuntivo; rosa, tecido mineralizado) - superfície SBAS, representando períodos de 2 (a-c) e 4 (d-f) semanas, respectivamente

No período de 2 semanas, as superfícies LS (Figura 16a,b,c) e LHS (Figura 17a,b,c), apresentaram um padrão diferente de MS e SBAS, sendo a formação de tecido ósseo de dentro para fora, no qual o sangue fica retido entre as rugosidades de superfície e favorece o processo de reparo. Observa-se também que o tecido ósseo se encontra concentrado nas duas primeiras roscas, além de ter maior maturação tecidual e alto grau de contato osso/implante. No período de 4 semanas (Figuras 16d,e,f, e 17d,e,f), observa-se que houve uma manutenção do contato entre o osso e a superfície do implante bem como a manutenção do volume ósseo maduro, concentrado nas duas primeiras roscas do implante.

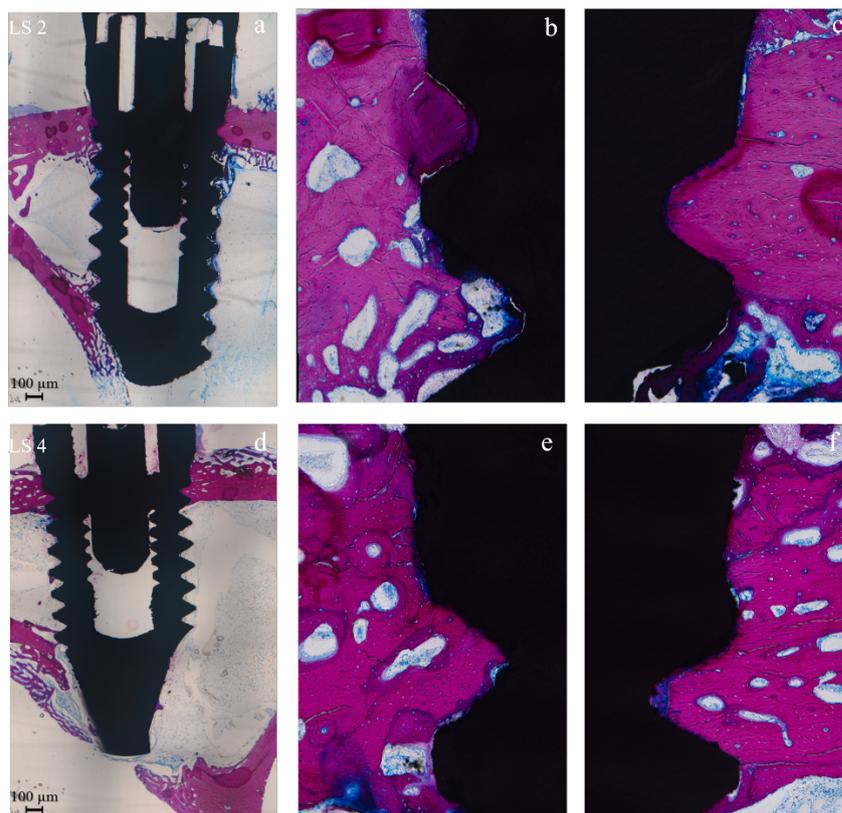


Fig. 16 Fotomicrografias representativas de seções, coradas em azul de Estevenel e fucsina ácida com ampliação de $1,6 \times$ (azul, tecido conjuntivo; rosa, tecido mineralizado) - superfície LS, representando períodos de 2 (a-c) e 4 (d-f) semanas, respectivamente

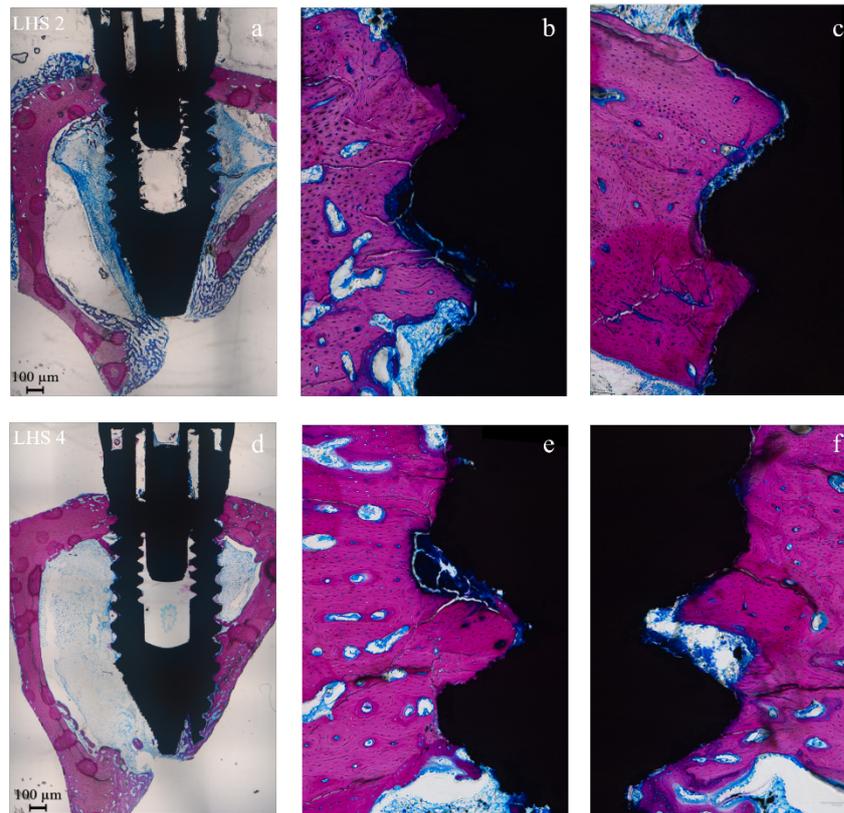


Fig. 17 Fotomicrografias representativas de seções, coradas em azul de Estevenel e fucsina ácida com ampliação de $1,6 \times$ (azul, tecido conjuntivo; rosa, tecido mineralizado) - superfície LHS, representando períodos de 2 (a-c) e 4 (d-f) semanas, respectivamente

Em aumento de $200 \times$ (Figura 18), podemos observar em todas as superfícies, tanto em 2 quanto em 4 semanas, a presença de tecido ósseo neoformado, com lacunas preenchidas por osteoblastos (setas vermelhas) e algumas lacunas vazias indicando osso em processo de remodelação (setas azuis). Em MS e SBAS, observa-se maior presença de tecido conjuntivo imaturo (corado pelo azul de Estevenel) interposto entre o osso e o implante e entre as trabéculas ósseas (setas amarelas), quando comparadas às superfícies LS e LHS, onde observa-se presença de tecido ósseo entre as rugosidades das superfícies (setas verdes), o que garante maior estabilidade ao implante.

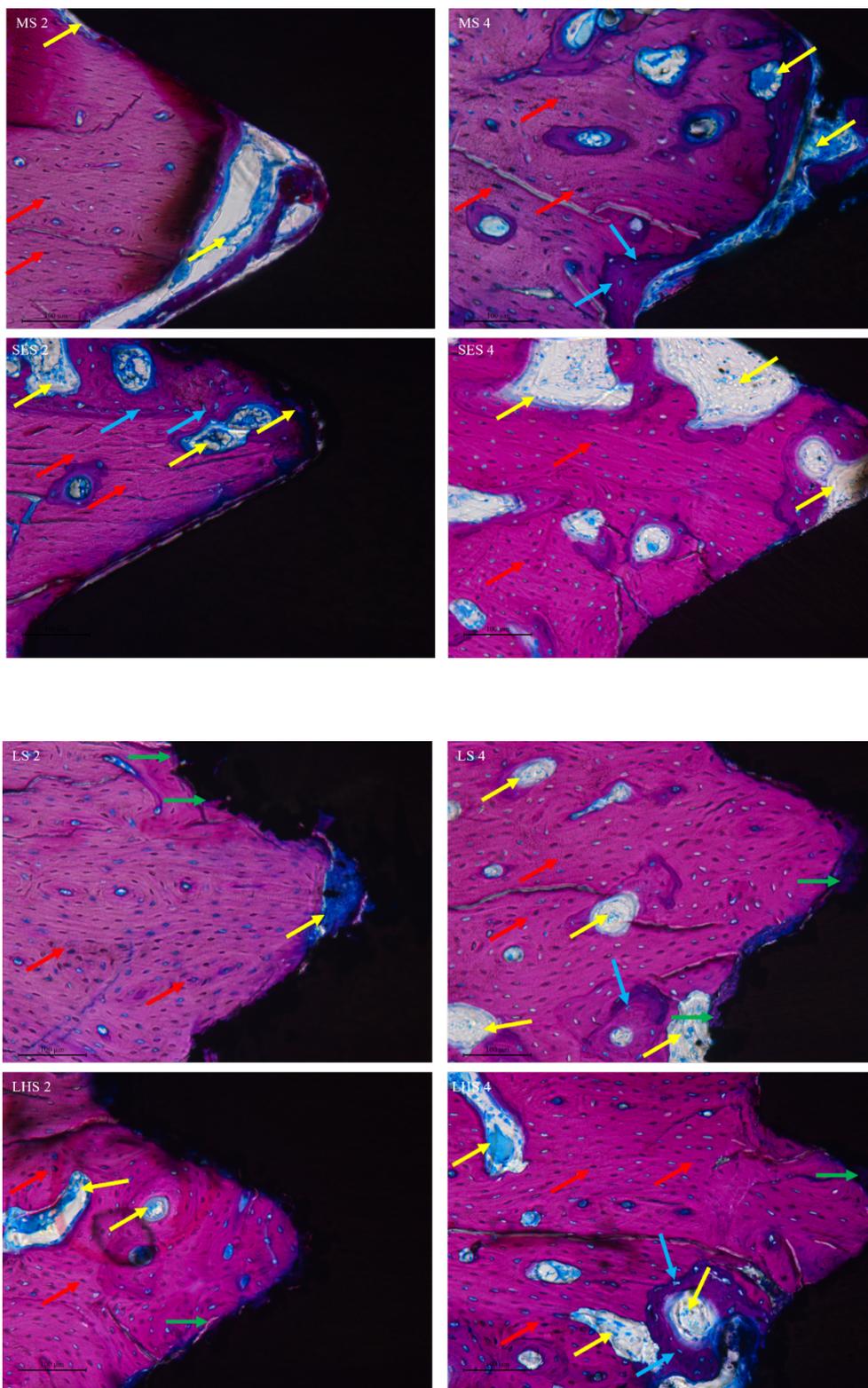


Fig. 18 Cortes Histológicos não-descalcificados da região cortical superior (azul de Stevenel e fucsina ácida, aumento de 200x). MS, SBAS, LS e LHS nos períodos de 2 e 4 semanas, respectivamente

4.3.4 Análise estatística

A *ELCOMI* dos implantes LS e LHS foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) a MS e SBAS no período de 2 semanas. No período de 4 semanas, houve diferença estatística entre as superfícies tratadas (LS e LHS) e a superfície usinada (MS). Os valores da média e desvio padrão em porcentagem da *ELCOMI* de todas as superfícies e períodos estão na tabela 4 e representados na figura 19.

Tabela 4 Média e desvio padrão da extensão linear entre osso mineralizado e implante (*ELCOMI*).

PERÍODO (SEMANAS)	GRUPOS			
	MS	SBAS	LS	LHS
2W	32,6 ± 7,2	34,6 ± 9,9	57,9 ± 10,0	62,5 ± 3,3
4W	38,6 ± 9,2	51,2 ± 4,7	60,5 ± 7,6	62,4 ± 7,5

Tabela 4. Nível de significância ($p < 0,05$) - Two-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas.

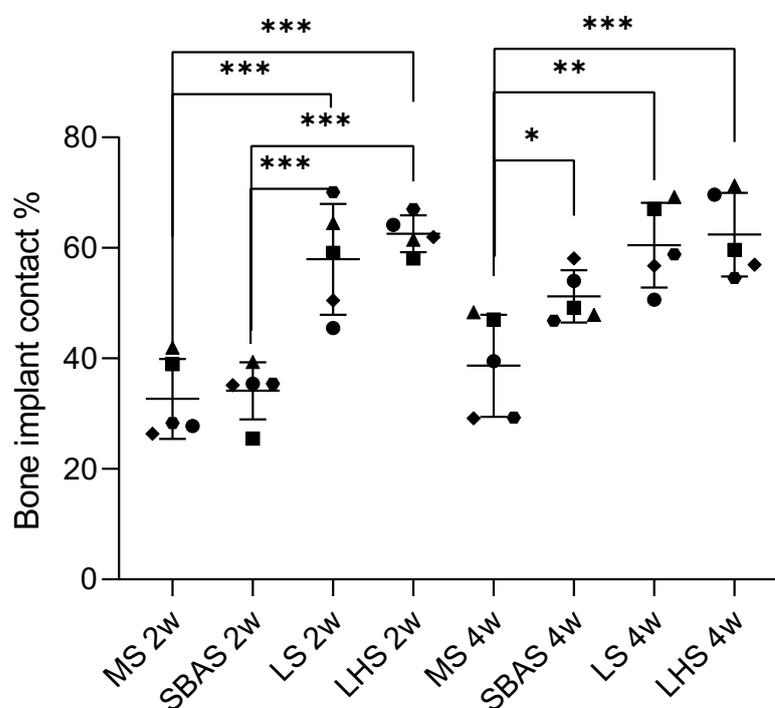


Fig. 19 Gráfico representando a porcentagem média por grupo da extensão linear entre osso mineralizado e implante (*ELCOMI*). Os dados representam amostras individuais com a mediana e DP. Diferença estatística $p < 0,05$, representado por *, **, *** - Two-way ANOVA e

teste de Tukey para comparações múltiplas. * $p=0,04$, ** $p=0,0002$, *** $p<0,0001$.

A AON dos implantes LHS foi estatisticamente superior ($p<0,05$) apenas a MS no período de 2 semanas. O padrão de área óssea neoformada foi semelhante entre as outras superfícies analisadas em ambos os períodos. Os valores da média e desvio padrão em porcentagem da AON de todas as superfícies em ambos os períodos estão na tabela 5, e representados na figura 20.

Tabela 5 Média e desvio padrão da área óssea neoformada (AON).

PERÍODO (SEMANAS)	GRUPOS			
	MS	SBAS	LS	LHS
2W	64,5 ± 12,1	66,2 ± 13,5	76,8 ± 5,8	80,8 ± 6,3
4W	69,2 ± 8,4	76,6 ± 9,7	76,3 ± 7,4	76,9 ± 5,9

Tabela 5. Nível de significância ($p<0,05$) - Two-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas.

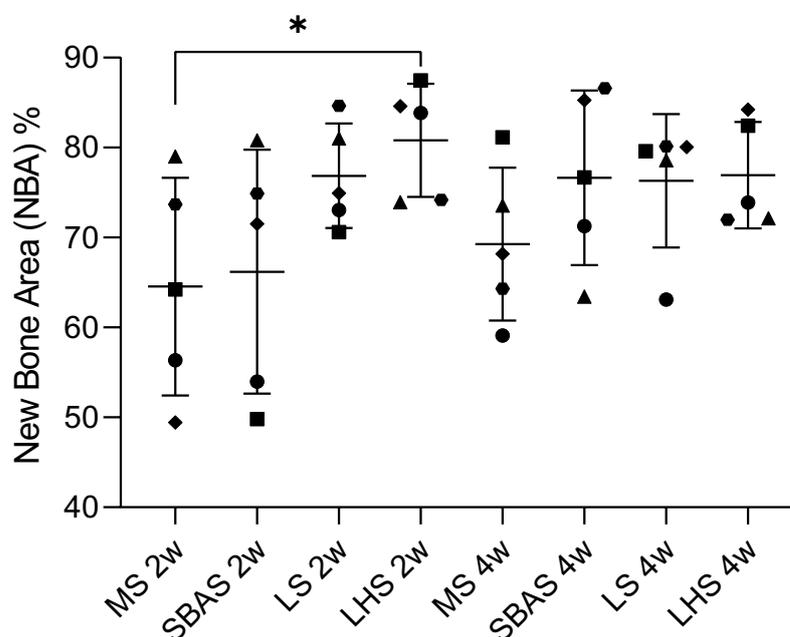


Fig. 20 Gráfico representando a porcentagem média por grupo da área de osso neoformado. Os dados representam amostras individuais com a mediana e DP. Diferença estatística $p < 0,05$, representado por * - Two-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. * $p=0,03$.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Os trabalhos iniciais de osseointegração desenvolvidos por Brånemark et al. [55] foram realizados usando titânio comercialmente puro (*Ti-cp*) com superfície usinada. Estes implantes eram instalados em região de osso de boa qualidade com o aguardo do período de cicatrização de 3 a 4 meses para mandíbula, e de 4 a 6 meses para maxila [56]. No entanto, estudo clínico prévio publicado [57] evidenciou um índice de sucesso de 81% em implantes instalados em maxila, que causou preocupação aos pesquisadores. Este fato estimulou novas medidas para aumentar o nível de sucesso e segurança na osseointegração, principalmente em condições desfavoráveis, como em situações de osso de baixa qualidade e ou comprometido. Entre estas medidas destacou-se a modificação da superfície do implante.

As modificações de superfície de implantes de titânio promovem importantes alterações de superfícies que favorecem a deposição de tecido ósseo [4–10, 27, 40, 58]. Uma superfície quando modificada, apresenta diferentes padrões de rugosidade que permitem a neoformação de tecido ósseo em contato direto com a superfície, mesmo em períodos iniciais, como 2 semanas, aumentando a estabilidade do implante. Várias metodologias foram desenvolvidas para a modificação da superfície entre elas plasma spray de titânio [59], condicionamento ácido [22], jateamento e associações [60], oxidação anódica [61] e modificação por feixe de laser [25]. Destaca-se a metodologia de ablação por laser por ser um método limpo, reproduzível e que promove a modificação físico-química da superfície [39]. Estudos mostraram que a ablação por laser na superfície possibilita a formação de uma camada rica em oxigênio e a incorporação de nitrogênio durante a rápida fusão e solidificação do titânio [6]. Além do mais, o padrão de rugosidade homogêneo e regular favorece a osseointegração, aumentando a área de contato osso/implante e aumentando os valores de torque de remoção [5–10, 40].

Estudos prévios avaliaram o padrão morfológico das superfícies tratadas e mostraram que a porcentagem de área óssea mineralizada formada sobre a superfície do implante está relacionada à topografia de superfície [6, 46, 62, 63]. Quando se relaciona os achados na literatura com os resultados obtidos no presente estudo observa-se que de fato as superfícies modificadas topograficamente apresentam um padrão rugoso homogêneo e bem definido tendem a mostrar resultados mais

favoráveis quando comparadas às superfícies não-tratadas. Na análise por MEV/EDX observa-se que as superfícies LS e LHS apresentaram superfícies rugosas, homogêneas, semelhantes a favos de mel e, conseqüentemente, maior área de contato osso/implante em análise quantitativa (ELCOMI).

A topografia da superfície e a rugosidade dos implantes dentários podem ter um impacto significativo no comportamento das células osteogênicas *in vitro* [64] e entender as características ideais da superfície para promover a fixação, proliferação e diferenciação celular é importante para melhorar o sucesso dos tratamentos com implantes dentários. Por conta disso, considerou-se relevante avaliar a resposta inflamatória de células expostas a superfícies tratadas com deposição de HA. Para tanto, utilizou-se a linhagem de células osteogênicas murinas MC3T3-E1 que tem sido frequentemente utilizada para elucidar as respostas de células ósseas a biomateriais [65] e células estromais derivadas da medula óssea (ST2), devido à sua capacidade proliferativa e capacidade para se diferenciar em múltiplos tipos de células [46]. Estudos publicados anteriormente usaram células MC3T3-E1 cultivadas em placas de titânio nano-HA e observaram que o HA aumentava a expressão de genes osteogênicos, como o fator de transcrição 2 relacionado ao runt (RUNX2), osteocalcina (OCN) e osteopontina (OPN) [66] e a atividade da fosfatase alcalina (ALP) [67]. No entanto, estudos têm demonstrado que as partículas de materiais utilizados como substitutos ósseos, como o HA, podem induzir a liberação de mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral-alfa ($TNF\alpha$), interleucinas (IL) IL1 α , IL1 β , IL6, IL8 e prostaglandina E2 (PGE2) *in vitro* em células humanas [68].

No presente estudo, foram apresentadas evidências convincentes de que o HA foi capaz de alterar a morfologia celular das células MC3T3-E1 e ST2, conforme mostrado nas Figuras 5 e 6, em que foi possível observar nas superfícies MS e SBAS uma maior confluência de células, quando comparadas às superfícies LS e LHS. Este fato por si só pode ser perfeitamente justificado pela presença de rugosidade com padrão homogêneo e regular nestas superfícies, permitindo que as células penetrem mais profundamente, dificultando parcialmente a visibilidade da confluência celular. Destaca-se que em estudos prévios publicados [5, 9] as superfícies LS e LHS apresentaram maiores valores de rugosidade média e em secção transversal, quando comparados a superfície usinada e por duplo ataque ácido.

Quando comparado a morfologia das células presentes em cada superfície, pode-se observar que em LHS a forma das células está levemente alterada, com baixa nitidez e fluorescência dos filamentos de actina. Um estudo anterior avaliou superfícies revestidas com cHA em comparação com poliestireno de cultura de tecidos (TCPS) em MC3T3-E1 para desenvolver técnicas para obter uma superfície uniformemente lisa que permaneceria aderida durante a cultura celular com revestimentos de cHA [69]. Os resultados obtidos mostraram que no TCPS as células estavam bem espalhadas, atingiram a confluência em 48h, com morfologia paralelepipedica típica de osteoblastos, semelhante aos resultados obtidos nas superfícies MS e SBAS do presente estudo (Figuras 5a,b e 6a,b), enquanto no cHA, as células foram menos espalhadas e alongadas, mantendo a morfologia mesmo no período de 48h, semelhante aos resultados obtidos na superfície LHS do presente estudo (Figuras 5d e 6d).

De acordo com nossos achados, a HA também foi capaz de reduzir a viabilidade celular em ambas as linhagens celulares utilizadas neste estudo. Na tabela 1, pode ser observado claramente que nas superfícies SBAS e LS a viabilidade celular média foi superior a 95% para células MC3T3-E1 e 110% para células ST2, e em LHS a viabilidade celular média não atingiu 70% em nenhum dos dois tipos celulares, mostrando que o HA é potencialmente tóxico para as células MC3T3-E1 e ST2 em um período de incubação de 72h. Resultados semelhantes foram apresentados anteriormente [69], onde foi observado que a taxa de fixação de células MC3T3-E1 foi menor no cHA ($49 \pm 3\%$) do que no TCPS ($83 \pm 8\%$), sem afetar a proliferação celular, uma vez que o número de células aumentaram no período de 48h quando comparado a 4h de incubação. Outros estudos que compararam discos tratados apenas com HAp e com compósitos HAp/fosfato de cálcio solúvel (HAp/SCaP) e observaram que a aderência e proliferação de MC3T3-E1 foi maior na combinação HAp/SCaP [65]. Em contraste, estudos mostraram a biocompatibilidade da nano HAp e uma maior proliferação de MSCs em comparação com a superfície somente de Ti ou superfície de revestimento de HA [70].

Para confirmar a possível ação pró-inflamatória do HA presente na superfície do LHS, foram realizados qRT-PCR e imunoenensaio para IL6. Os resultados são apresentados nas Figuras 7 e 8, que representam os valores de GAPDH, utilizado como gene de referência devido à sua estabilidade, expressão gênica de IL6 e nível

de proteína, respectivamente. Os valores de GAPDH representados nas Figuras 7a e 8a indicam o número de ciclos necessários para a identificação das moléculas de cDNA. Estudos demonstraram que o valor de Cq (ciclo de quantificação) varia entre 17 e 37 ciclos [71], o que significa que quanto mais ciclos forem necessários, menos moléculas de cDNA estarão presentes na amostra. Os valores de GAPDH para LHS foram estatisticamente maiores em ambas as linhagens celulares, comprovando que a quantidade de RNA extraído na superfície de LHS e, conseqüentemente cDNA, foi estatisticamente menor do que nas demais superfícies. No presente estudo, optou-se pelo uso de IL6 devido aos seus efeitos sobre as células da linhagem hematopoiética e células da linhagem mesenquimal [72]. A expressão do gene IL6 obtida em qRT-PCR de células MC3T3-E1 e ST2 é apresentada nas Figuras 7b e 8b, respectivamente. Observa-se que houve diferença significativa na superfície do LHS quando comparado ao SBAS e LS em ambos os tipos celulares. Resultados consistentes foram observados no nível de proteína, onde a expressão de IL6 na superfície LHS foi estatisticamente superior a outras superfícies em ambos os tipos de células (Figuras 7c e 8c).

No presente estudo as análises realizadas *in vivo* objetivaram avaliar os períodos precoces (2 e 4 semanas) do reparo ósseo periimplantar, no intuito de complementar resultados obtidos em estudos prévios, que avaliaram o reparo periimplantar nos períodos de 4, 8 e 12 semanas [5, 6, 8, 9]. Assim, os resultados encontrados nesta pesquisa mostraram que as modificações físico-químicas ocorridas em LS e LHS foram importantes, favoráveis e benéficas, permitindo maiores valores de taxa de aposição óssea e de contato ósseo periimplantar. No entanto, destaca-se que estes valores descritos acima encontrados no período de 2 semanas, talvez não sejam definitivamente suficientes para permitir um carregamento oclusal muito precoce. Pode-se inferir que o processo de reparo ósseo periimplantar é tempo dependente, embora algumas superfícies apresentem maior tempo dependência, como é o caso de MS e SBAS.

Parâmetros microtomográficos foram avaliados no presente estudo e foi observado no período de 2 semanas que a superfície LHS apresentou porcentagem de volume ósseo (BV/TV) estatisticamente superior a MS e SBAS e a superfície LS superior a MS. Estes achados corroboram com os achados obtidos nas análises ELCOMI e MAR em que as superfícies LS e LHS aceleraram as fases iniciais do

processo de reparo ósseo periimplantar. Quando avaliado a porosidade total (Po.tot), a superfície SBAS mostrou a formação de um osso mais poroso, apresentando diferença estatística com a superfície LHS. Nos demais parâmetros (número, separação e espessura de trabéculas) não foram encontrados diferenças entre as superfícies analisadas.

A ELCOMI em tecidos mineralizados tem sido uma metodologia “padrão ouro” para avaliação da formação óssea periimplantar [60, 73]. No presente estudo foi possível observar que a ELCOMI em porcentagem de LS ($57,94 \pm 10,04$ e $60,50 \pm 7,64$ em 2 e 4 semanas respectivamente) e LHS ($62,56 \pm 3,31$ e $62,40 \pm 7,58$ em 2 e 4 semanas respectivamente) foram estatisticamente superiores a MS ($32,68 \pm 7,22$) e SBAS ($34,69 \pm 9,93$) no período de 2 semanas e a MS ($38,67 \pm 9,24$) no período de 4 semanas. Estes achados corroboram com os resultados encontrados na microscopia confocal a laser que avalia entre outras análises a taxa de aposição óssea (MAR). A MAR é obtida através de mensurações realizadas em imagens com sobreposição de fluorocromos calceína e alizarina. [46] Neste sentido, a MAR de LHS foi estatisticamente superior a MS e SBAS, bem como LS estatisticamente superior a MS no período de 4 semanas. Não foi possível aplicar esta metodologia no período de 2 semanas, por não haver tempo hábil para aplicação dos 2 marcadores epifluorescentes, por se tratar de um período muito precoce de avaliação.

Nossos achados têm implicações clínicas relevantes. A utilização de biomateriais no revestimento de implantes dentários visa facilitar e acelerar o processo de reparação óssea, favorecendo assim o processo de osseointegração. Respostas favoráveis foram observadas em estudos *in vitro*, onde o HA presente nas superfícies dos discos de titânio favoreceu a diferenciação celular em osteoblastos, além de aumentar a expressão de ALP [67, 74, 75], OCN e OPN [66]. No entanto, quando mudamos a abordagem para avaliar os efeitos inflamatórios, como nos resultados obtidos no presente estudo, observamos que o HA presente nessas superfícies pode aumentar significativamente a expressão de IL6, mostrando uma possível toxicidade nos períodos iniciais.

Estudos *in vivo* também mostraram que implantes tratados com laser seguido de deposição de HA obtiveram resultados promissores, com maiores valores de torque reverso e maior quantidade de osso neoformado nos períodos iniciais, quando comparados a implantes usinados e implantes tratados com jateamento seguido de

ácido duplo ataque [17]. Bem como este estudo, o qual mostrou que a modificação da superfície do implante por laser com ou sem recobrimento de HA sem tratamento térmico proporcionou importantes modificações físico-químicas, permitindo uma modelagem anabólica mais rápida e com melhores níveis de contato osso/implante. Logo, pode-se inferir que com o uso destas superfícies torna-se viável o carregamento precoce dos implantes ou uso de implantes com estas superfícies em situações desfavoráveis, como tecido ósseo de baixa densidade e em situações de osso comprometido.

As limitações deste estudo devem ser destacadas. Considerando que experimentos *in vitro* foram realizados, padrões simulados foram criados para mimetizar organismos complexos, mas eles não representam a situação clínica. Existem várias técnicas de deposição, com diferentes derivados de fosfato tricálcico e no presente estudo, apenas o revestimento HA sem tratamento térmico e laser foi testado, uma vez que estudos prévios publicados mostraram que a LHS foi a superfície que apresentou maiores valores de torque de remoção [5] e contato ósseo periimplantar [9]. No entanto, novos estudos podem ser necessários no intuito de avaliar diferentes tamanhos e formas de partículas de HA, bem como métodos de deposição, ligas de titânio e avaliações de períodos iniciais e tardios, para entender em quais condições, especificamente, o HA é benéfico para as células e quais métodos devem ser evitados. Podemos destacar também o comportamento das superfícies experimentais LS e LHS mediante tempo de bancada, uma vez que o tempo de bancada de MS e SBAS já está bem documentado pela literatura [76].

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Deste modo, conclui-se que, por mais que a adição de HA na superfície LHS tenha provocado um aumento na expressão de IL6, as modificações experimentais em LS e LHS foram importantes, favoráveis e benéficas, permitindo maiores valores de taxa de aposição óssea e de contato ósseo periimplantar *in vivo*.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Brånemark PI, Adell R, Albrektsson T, et al (1983) Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials* 4:25–8. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(83\)90065-0](https://doi.org/10.1016/0142-9612(83)90065-0)
2. Shibli JA, Grassi S, de Figueiredo LC, et al (2007) Influence of implant surface topography on early osseointegration: a histological study in human jaws. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 80:377–85. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30608>
3. Albrektsson T, Wennerberg A (2004) Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 17:536–43
4. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y (2007) Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 23:844–54. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.06.025>
5. Queiroz TP, Souza FÁ, Guastaldi AC, et al (2013) Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 24:896–903. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02471.x>
6. Souza FA, Queiroz TP, Guastaldi AC, et al (2013) Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with surfaces modified by laser with and without silicate deposition: biomechanical and scanning electron microscopy analysis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 101:76–84. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32818>
7. Sisti KE, Piattelli A, Guastaldi AC, et al (2013) Nondecalcified histologic study of bone response to titanium implants topographically modified by laser with and without hydroxyapatite coating. *Int J Periodontics Restorative Dent* 33:689–96. <https://doi.org/10.11607/prd.1151>
8. Souza FÁ, Queiroz TP, Sonoda CK, et al (2014) Histometric analysis and topographic characterization of cp Ti implants with surfaces modified by laser with and without silica deposition. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 102:1677–88. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33139>
9. Queiroz TP, de Molon RS, Souza FÁ, et al (2017) In vivo evaluation of cp Ti implants with modified surfaces by laser beam with and without hydroxyapatite

- chemical deposition and without and with thermal treatment: topographic characterization and histomorphometric analysis in rabbits. *Clin Oral Investig* 21:685–699. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1936-7>
10. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, et al (2009) Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. *J Oral Maxillofac Surg* 67:1706–15. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2009.03.046>
 11. Schwartz Fo HO, Novaes AB, de Castro LMS, et al (2007) In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res* 18:333–44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01313.x>
 12. Elias CN, Muller CA Caracterização e torque de remoção de implantes dentários com superfície bioativa Dental implant with bioactive surface
 13. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–75
 14. Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD (1996) Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech* 33:214–31. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19960201\)33:2<214::AID-JEMT11>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19960201)33:2<214::AID-JEMT11>3.0.CO;2-X)
 15. de Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A (2003) Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem* 51:633–41. <https://doi.org/10.1177/002215540305100509>
 16. Rosa AL, Crippa GE, de Oliveira PT, et al (2009) Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Implants Res* 20:472–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01662.x>
 17. de Oliveira PT, Nanci A (2004) Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 25:403–13. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00539-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00539-8)
 18. de Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, et al (2007) Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A* 80:554–64. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30955>

19. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang B-S, et al (2010) Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol* 28:198–206. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.003>
20. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang B-S, et al (2010) Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol* 28:198–206. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.003>
21. Souza FÁ, Furtado TSM, Dayube URC, et al (2019) Comparative in vivo study of alloy titanium implants with two different surfaces: biomechanical and SEM analysis. *Clin Oral Investig* 23:4383–4397. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02872-6>
22. Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A (1997) Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 8:442–7. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1997.080601.x>
23. Amarante ES, de Lima LA (2001) [Optimization of implant surfaces: titanium plasma spray and acid-etched sandblasting -- current status]. *Pesqui Odontol Bras* 15:166–73. <https://doi.org/10.1590/s1517-74912001000200015>
24. Carlsson L, Röstlund T, Albrektsson B, Albrektsson T (1988) Removal torques for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 3:21–4
25. Gaggl A, Schultes G, Müller WD, Kärcher H (2000) Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces--a comparative study. *Biomaterials* 21:1067–73. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00002-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00002-8)
26. Braga FJC, Marques RFC, Filho E de A, Guastaldi AC (2007) Surface modification of Ti dental implants by Nd:YVO 4 laser irradiation. *Appl Surf Sci* 253:9203–9208. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2007.05.048>
27. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, et al (2009) Evaluation of titanium implants with surface modification by laser beam. Biomechanical study in rabbit tibias. *Braz Oral Res* 23:137–43. <https://doi.org/10.1590/s1806-83242009000200008>
28. Pálka V, Postrková E, Koerten HK (1998) Some characteristics of hydroxylapatite powder particles after plasma spraying. *Biomaterials* 19:1763–72. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(98\)00087-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00087-8)

29. Guo L, Li H (2004) Fabrication and characterization of thin nano-hydroxyapatite coatings on titanium. *Surf Coat Technol* 185:268–274. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2004.01.013>
30. Oyane A, Onuma K, Ito A, et al (2003) Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids. *J Biomed Mater Res A* 64:339–48. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10426>
31. Kokubo T, Takadama H (2006) How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27:2907–15. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>
32. Lin CM, Yen SK (2006) Biomimetic growth of apatite on electrolytic TiO₂ coatings in simulated body fluid. *Materials Science and Engineering C* 26:54–64. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.06.048>
33. Vidigal GM, Groisman M, de Sena LA, Soares G de A (2009) Surface characterization of dental implants coated with hydroxyapatite by plasma spray and biomimetic process. *Implant Dent* 18:353–61. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e3181ac9a3d>
34. Filho EA, Félix Fraga A, Admar Bini R, Carlos Guastaldi A Obtenção de fosfatos de cálcio pelo método biomimético sobre a superfície da liga Ti-6Al-4V modificada pelo laser Nd:YAG Calcium phosphates obtained by the biometric method onto the Ti-6Al-4V alloy surface modified by a Nd:YAG laser
35. Kessler-Liechti G, Zix J, Mericske-Stern R (2008) Stability measurements of 1-stage implants in the edentulous mandible by means of resonance frequency analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 23:353–8
36. Thomas KA, Cook SD (1992) Relationship between surface characteristics and the degree of bone-implant integration. *J Biomed Mater Res* 26:831–3. <https://doi.org/10.1002/jbm.820260612>
37. Xavier SP, Carvalho PSP, Beloti MM, Rosa AL (2003) Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. *J Dent* 31:173–80. [https://doi.org/10.1016/s0300-5712\(03\)00027-7](https://doi.org/10.1016/s0300-5712(03)00027-7)
38. Qahash M, Hardwick WR, Rohrer MD, et al (2007) Surface-etching enhances titanium implant osseointegration in newly formed (rhBMP-2-induced) and native bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 22:472–7

39. Cho S-A, Jung S-K (2003) A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials* 24:4859–63. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00377-6](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00377-6)
40. Sisti KE, de Andrés MC, Johnston D, et al (2016) Skeletal stem cell and bone implant interactions are enhanced by LASER titanium modification. *Biochem Biophys Res Commun* 473:719–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.013>
41. Alghamdi HS (2018) Methods to Improve Osseointegration of Dental Implants in Low Quality (Type-IV) Bone: An Overview. *J Funct Biomater* 9:. <https://doi.org/10.3390/jfb9010007>
42. NemȚoi A, Trandafir V, Pașca AS, et al (2017) Osseointegration of chemically modified sandblasted and acid-etched titanium implant surface in diabetic rats: a histological and scanning electron microscopy study. *Rom J Morphol Embryol* 58:881–886
43. Zhou W, Tangl S, Reich KM, et al (2019) The Influence of Type 2 Diabetes Mellitus on the Osseointegration of Titanium Implants With Different Surface Modifications-A Histomorphometric Study in High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Treated Rats. *Implant Dent* 28:11–19. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000836>
44. Oue H, Doi K, Oki Y, et al (2015) Influence of implant surface topography on primary stability in a standardized osteoporosis rabbit model study. *J Funct Biomater* 6:143–52. <https://doi.org/10.3390/jfb6010143>
45. Najeeb S, Zafar MS, Khurshid Z, et al (2017) Bisphosphonate releasing dental implant surface coatings and osseointegration: A systematic review. *J Taibah Univ Med Sci* 12:369–375. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2017.05.007>
46. Aparecida AH, Fook MVL, Guastaldi AC (2009) Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. *J Mater Sci Mater Med* 20:1215–22. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3682-0>
47. Goldberg AJ, Liu Y, Advincula MC, et al (2010) Fabrication and characterization of hydroxyapatite-coated polystyrene disks for use in osteoprogenitor cell culture. *J Biomater Sci Polym Ed* 21:1371–87. <https://doi.org/10.1163/092050609X12517190417830>
48. Xu W, Xu C, Yi J, Dai H (2018) The effect of different hydroxyapatite microparticles on the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts. *J Mater Chem B* 6:5234–5242. <https://doi.org/10.1039/c8tb01352g>

49. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group (2010) Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *J Physiol* 588:2519–21. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.192278>
50. Luvizuto ER, Dias SSMD, Okamoto T, et al (2011) Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol* 56:984–90. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.015>
51. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, et al (2015) Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt* 20:038003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.3.038003>
52. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, et al (2015) Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 44:798–805. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2015.02.018>
53. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, et al (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25:1468–86. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>
54. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, et al (2013) Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 28:2–17. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1805>
55. Brånemark PI, Adell R, Breine U, et al (1969) Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3:81–100. <https://doi.org/10.3109/02844316909036699>
56. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J (1981) Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 52:155–70. <https://doi.org/10.3109/17453678108991776>
57. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI (1981) A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 10:387–416. [https://doi.org/10.1016/s0300-9785\(81\)80077-4](https://doi.org/10.1016/s0300-9785(81)80077-4)
58. Albrektsson T, Wennerberg A (2004) Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 17:536–43

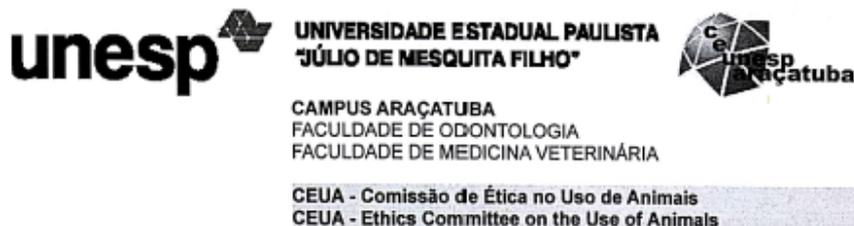
59. Ledermann PD, Schenk RK, Buser D (1998) Long-lasting osseointegration of immediately loaded, bar-connected TPS screws after 12 years of function: a histologic case report of a 95-year-old patient. *Int J Periodontics Restorative Dent* 18:552–63
60. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, et al (1991) Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 25:889–902. <https://doi.org/10.1002/jbm.820250708>
61. Son W, Zhu X, Shin H, et al (2003) In vivo histological response to anodized and anodized/hydrothermally treated titanium implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 66:520–5. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10042>
62. Kokubo T, Kim H-M, Kawashita M (2003) Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 24:2161–75. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00044-9](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00044-9)
63. Schepers EJ, Ducheyne P, Barbier L, Schepers S (1993) Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implant Dent* 2:151–6. <https://doi.org/10.1097/00008505-199309000-00002>
64. Costa DO, Prowse PDH, Chrones T, et al (2013) The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings. *Biomaterials* 34:7215–26. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.014>
65. Ozawa S, Kasugai S (1996) Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramics, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture. *Biomaterials* 17:23–9. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)80751-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)80751-4)
66. Kargarpour Z, Nasirzade J, Panahipour L, et al (2021) Platelet-Rich Fibrin Decreases the Inflammatory Response of Mesenchymal Cells. *Int J Mol Sci* 22:.. <https://doi.org/10.3390/ijms222111333>
67. Panahipour L, Omerbasic A, Nasirzade J, Gruber R (2021) TGF- β Activity of a Demineralized Bone Matrix. *Int J Mol Sci* 22:.. <https://doi.org/10.3390/ijms22020664>
68. Lu R-J, Wang X, He H-X, et al (2019) Tantalum-incorporated hydroxyapatite coating on titanium implants: its mechanical and in vitro osteogenic properties. *J Mater Sci Mater Med* 30:111. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6308-9>

69. Narducci P, Nicolini V (2009) Differentiation of activated monocytes into osteoclast-like cells on a hydroxyapatite substrate: an in vitro study. *Ann Anat* 191:349–55. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2009.02.009>
70. Costa DO, Prowse PDH, Chrones T, et al (2013) The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings. *Biomaterials* 34:7215–26. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.014>
71. Ogata K, Imazato S, Ehara A, et al (2005) Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites. *J Biomed Mater Res A* 72:127–35. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30146>
72. Chen F, Lam WM, Lin CJ, et al (2007) Biocompatibility of electrophoretical deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on roughen titanium surface: in vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 82:183–91. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30720>
73. Watzak G, Zechner W, Ulm C, et al (2005) Histologic and histomorphometric analysis of three types of dental implants following 18 months of occlusal loading: a preliminary study in baboons. *Clin Oral Implants Res* 16:408–16. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01155.x>
74. Velard F, Schlaubitz S, Fricain J-C, et al (2015) In vitro and in vivo evaluation of the inflammatory potential of various nanoporous hydroxyapatite biomaterials. *Nanomedicine (Lond)* 10:785–802. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.12>
75. Harada Y, Wang JT, Doppalapudi VA, et al (1996) Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res* 31:19–26. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199605\)31:1<19::AID-JBM3>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199605)31:1<19::AID-JBM3>3.0.CO;2-T)
76. Worthington P (2005) Sterility of packaged implant components. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20:461

Anexos

ANEXOS

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do processo de reparo ao redor de implantes com superfícies modificada por laser com e sem recobrimento de hidroxiapatita. Estudo biomecânico, por MEV e imunohistoquímica em coelhos", Processo FOA nº 00554-2018, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 20 de Julho de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 10 de Janeiro de 2020.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Fevereiro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the repair process around implantes with laser modified surfaces with and without deposition of HA. Biomechanical, MEV and immunohistochemistry study in rabbits", Protocol FOA nº 00554-2018, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 20, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 10, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: February 10, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
 Coordenador da CEUA
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
 Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
 Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B – Ilustrações das fases cirúrgica e/ou laboratorial da metodologia experimental ou algo equivalente. Outras ilustrações, tais como: gráficos, tabelas com os dados dos trabalhos e outras informações que não fazem parte do artigo a ser enviado para publicação

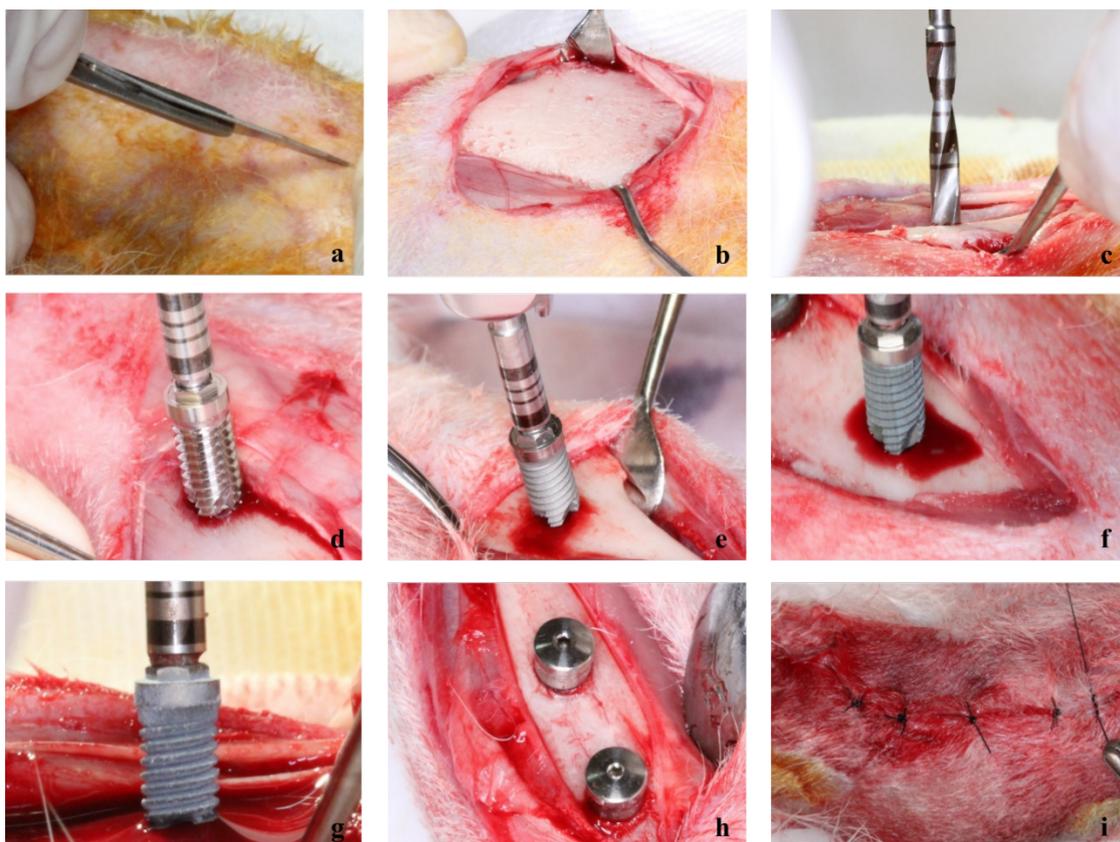


Figura complementar 1. **a-** incisão na face lateral da tíbia; **b-** descolamento dermoperiosteal; **c-** fresagem escalonada para preparo do alvéolo cirúrgico; **d-** instalação de implante MS; **e-** instalação de implante SBAS; **f-** instalação de implante LS; **g-** instalação de implante LHS; **h-** instalação do parafuso de cobertura e posicionamento dos implantes; **i-** sutura por planos.

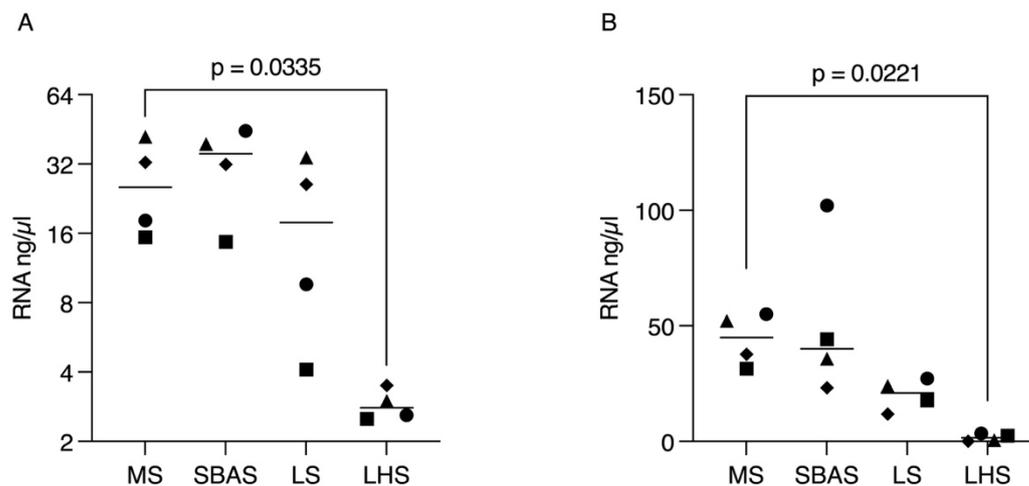


Figura complementar 2. Quantificação de microvolume NanoDrop de RNA em $\text{ng}/\mu\text{l}$. (a) linhagem celular osteogênica murina MC3T3-E1 e (b) células estromais derivadas da medula óssea ST2. Os dados representam a qualidade medida por A260 de experimentos individuais com a mediana. A análise estatística foi baseada em One-way ANOVA e os valores de p corrigidos foram indicados.