

HELDO CESAR FIGUEIRA JÚNIOR

**TRATAMENTO BIOMIMÉTICO DE DISCOS E IMPLANTES DE TITÂNIO COM
ALENDRONATO. CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA, ESTUDO
HISTOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO EM COELHOS**

Araçatuba – SP

2018

HELDO CESAR FIGUEIRA JÚNIOR

**TRATAMENTO BIOMIMÉTICO DE DISCOS E IMPLANTES DE TITÂNIO COM
ALENDRONATO. CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA, ESTUDO
HISTOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO EM COELHOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - FOA, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do grau de “doutor em odontologia” - Área de concentração Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Adj. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Coorientadora: Prof. Adj. Dra. Roberta Okamoto

Araçatuba – SP

2018

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F475t Figueira Júnior, Helder Cesar.
Tratamento biomimético de discos e implantes de titânio com alendronato: caracterização topográfica, estudo histométrico e imunoistoquímico em coelhos / Helder Cesar Figueira Júnior. - Araçatuba, 2018
82 f. : il.; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Junior
Coorientadora: Profa. Roberta Okamoto

1. Substitutos ósseos 2. Materiais biocompatíveis 3.
Implantes dentários 4. Alendronato

Black D7
CDD 617.6

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao amor da minha vida, à pessoa que ao meu lado constrói dia-a-dia a nossa família. Obrigado pelo suporte, pela paciência, pelo respeito, pela confiança, pela proteção, pelo amor acima de tudo, por dividir comigo momentos de tamanha alegria como este e outros que ainda virão. Você é mais do que um dia eu sonhei, você é mais do que eu mereço, você é a razão de todo o meu esforço. Te amo Fairuzze Figueira.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP), ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, ao Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao meu orientador Idelmo Rangel, pelo incentivo, pela ajuda no custeio, por estar sempre disposto a doar seu escasso tempo, pela forma reta e respeitosa que sempre me tratou, por mais de uma vez confiar que eu seria capaz de chegar até aqui.

Aos professores Leonardo Faverani, Roberta Okamoto e Alberto Delbem, pela participação ativa nesta pesquisa, pela orientação, pela paciência e disposição durante estes anos de desenvolvimento do trabalho.

Ao amigo Francisley Ávila que foi mais que um professor, que esteve sempre disposto à conversa, instrução, incentivo, que investiu em minha formação cirúrgica e acadêmica.

Aos demais professores e funcionários da instituição, em especial Cristiane Lui, Lilian Mada, Valéria Zagatto, Renato de Oliveira, Marco Ianner, Paulo Gratão, João Correa e Camilo Venâncio. Agradeço pelas inúmeras colheres de chá, pela paciência, e por possibilitar que tudo se tornasse possível.

Aos meus pais, por todo apoio, amor, paciência e incentivo. Pelo exemplo de simplicidade, coragem, caráter, fé e persistência que tento seguir todos os dias estendendo para minha vida profissional.

À minha irmã Jéssica por acreditar e incentivar, pelo carinho mesmo que distante, por saber que ela sempre estará torcendo por mim assim como torço por ela.

Aos amigos de turma André Fabris, Eduardo Ribeiro, Willian Pires, e em especial Sabrina Ferreira. Eu não teria conseguido se não fosse a boa disposição e prontidão de vocês. Minha eterna gratidão.

Aos colegas Vilmar Gottardo e Robson Ravel pela amizade e por vezes renovar meu ânimo dentro da educação continuada.

Aos meus colegas de plantão, os mestrandos de forma geral, que dividiram estes momentos de tamanho aprendizado e tensão. Desejo-lhes um futuro doce e cheio de vitórias.

Aos amigos Leila Bonetti, Antônio Bonetti, Jordan Bonetti, Gabriel Lins, Amanda Moreira, Rafael Murilo, Mariana Laforga, Bruno e Tallita Ceribelli, mesmo que não saibam vocês têm papel fundamental nessa conquista. Obrigado por se dedicarem também aos meus problemas, pela alegria que sinto com a nossa amizade, pelo respeito que têm por mim, por me tratarem como família, por dividirem minhas angústias e comemorações. Prezo pela felicidade ilimitada de vocês.

Aos meus familiares e a todos que me apoiaram, que torcem por mim, que me orientam, que me dão palavras de vitória, que oram por mim, que se dedicaram também a este trabalho, aos que acreditam no meu trabalho, contem comigo.

A Implalife Indústria de Produtos Médico Odontológicos Ltda, à Michelle Marques, à Franciane Silva, à Hélide e demais integrantes da equipe de suporte que nos cerca. Vocês nos tratam com carinho fraterno e respeito. Que Deus superabunde em vossas vidas o que fazem por nós gratuitamente.

“Se não for o SENHOR o construtor da casa, será inútil trabalhar na construção.
Se não é o SENHOR que vigia a cidade, será inútil a sentinela montar guarda.
Será inútil levantar cedo e dormir tarde, trabalhando arduamente por alimento.
O SENHOR concede sustento aos seus amados enquanto dormem.” (Salmo 127:1-3)

RESUMO

Figueira Júnior HC. Tratamento biomimético de discos e implantes de titânio com alendronato. Caracterização topográfica, estudo histométrico e imunoistoquímico em coelhos [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2018.

RESUMO

Tratamentos de superfície de materiais implantáveis no corpo humano são analisados incansavelmente dentro das áreas da saúde. É comum ser observado em artigos científicos o emprego de um recente e desconhecido biomaterial sendo analisado para este fim. O objetivo deste estudo foi avaliar o emprego do alendronato sobre a caracterização topográfica de implantes e discos de titânio *in vitro*, e sobre a superfície de implantes de titânio inseridos em coelhos após levantamento de seio maxilar, correlacionando as respostas biológicas e físicas do tratamento comparadas a protocolos bem estabelecidos da implantodontia. Utilizou-se seis discos e vinte e seis implantes dentários ambos de titânio comercialmente puro. Para as análises topográficas, discos e implantes se dividiram em 2 grupos de 3 amostras: Grupo CTL, submetidos a subtração ácida e grupo ALD, submetidos a tratamento biomimético com alendronato. Para os testes em animais, 5 implantes foram distribuídos por grupo, CTL e ALD, com intervalos de eutanásia de 7 e 40 dias. Após microscopia eletrônica de varredura, análise de espectroscopia por energia dispersiva, análise do ângulo de contato com a água, de energia livre de superfície e da presença de sítios doares de elétrons (base de Lewis), os grupos ALD apresentaram resposta satisfatória frente aos processos aceitos em saúde, sendo superiores em todas as análises. A resposta histométrica também foi mensurada resultando em maior tecido ósseo nas análises ELCOI e AON nos grupos ALD 40 dias. A discreta presença do TRAP aos 40 dias se refere a baixa reabsorção óssea no momento testado, fator relacionado ao uso de um bisfosfonato à nível local. A osteocalcina em 7 dias sugere uma atividade celular propícia à neoformação. Os tratamentos de biomiméticos são válidos uma vez que, frente aos testes realizados, melhoram a interação dos implantes a nível celular. O alendronato pode ser empregado para os fins propostos resultando em melhora do processo de reparo ósseo. **Palavras-chave:** Substitutos ósseos; Biomateriais; Implantes dentários; Alendronato.

ABSTRACT

Figueira Júnior HC. Biomimetic treatment of titanium disks and implants with alendronate. Topographic characterization, histometric and immunohistochemical study in rabbits [thesis]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2018.

ABSTRACT

Surface treatments of implantable materials in the human body are analyzed tirelessly within the health areas. It is common to observe in scientific articles the use of a recent and unknown biomaterial being analyzed for this purpose. The objective of this study was to evaluate the use of alendronate on the topographic characterization of implants and titanium discs *in vitro*, and over the surface of titanium implants inserted into rabbits after maxillary sinus lift, correlating the biological and physical responses of the treatment compared to well established implantology protocols. It was used six disks and twenty-six commercially pure titanium dental implants. For the topographic analyzes, disks and implants were divided into 2 groups of 3 samples: CTL group, submitted to acid subtraction and ALD group, submitted to biomimetic treatment with alendronate. For the animal tests, 5 implants were distributed per group, CTL and ALD, with euthanasia intervals of 7 and 40 days. After scanning electron microscopy, analysis of energy dispersive spectroscopy, analysis of the water contact angle, free surface energy and the presence of electron's donor sites (Lewis base), the ALD groups showed a satisfactory response to the accepted processes in health, being superior in all the analyzes. The histometric response was also measured resulting in increased bone tissue in the ELCOI and AON analyzes in the ALD 40 days' group. The discrete presence of TRAP at 40 days refers to low bone resorption at the time tested, a factor related to the use of a bisphosphonate. Osteocalcin in 7 days suggests a cellular activity conducive to neoformation. Biomimetic treatments are valid since, given the tests performed, they improve the interaction at the cellular level. Alendronate can be used for the proposed applications resulting in a better bone repair process. **Keywords:** Bone substitutes; Biocompatible materials; Dental implants; Alendronate.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Etapas do procedimento cirúrgico. (a, b) Exposição do dorso nasal e acesso à parede óssea; (c, d, e) Osteotomias para preparo da janela cirúrgica; (f, g, h) Levantamento da membrana sinusal, instalação do implante e do parafuso de cobertura; (i) Sutura.....65
- Figura 2 Imagens representativas dos discos submetidos aos tratamentos nas magnificações de 500, 1000, 5000 e 10000x em MEV.....66
- Figura 3 Imagens representativas dos terços cervicais dos implantes submetidos aos tratamentos nas magnificações de 500, 1000, 5000 e 10000x em MEV.....67
- Figura 4 Imagens representativas dos terços médios dos implantes submetidos aos tratamentos nas magnificações de 500, 1000, 5000 e 10000x em MEV.....68
- Figura 5 Imagens representativas dos terços apicais dos implantes submetidos aos tratamentos nas magnificações de 500, 1000, 5000 e 10000x em MEV.....69
- Figura 6 Representação gráfica dos dados obtidos frente ao percentual de peso cálcio e fósforo presentes na superfície das amostras selecionadas dentre os grupos CTL e ALD.....70
- Figura 7 Fotomicrografias da análise imunoistoquímica para osteocalcina com 7 e 40 dias.....71

Figura 8	Fotomicrografias da análise imunoistoquímica para TRAP com 7 e 40 dias.....	72
Figura 9	Fotomicrografias da análise histológica para ELCOI entre os grupos CTL e ALD para 7 e 40 dias.....	73
Figura 10	Fotomicrografias da análise histológica para AON entre os grupos CTL e ALD para 7 e 40 dias.....	74
Figura 11	Gráfico da ELCOI comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em mm das amostras aos 7 dias ($p = 0,757$).....	75
Figura 12	Gráfico da ELCOI comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em mm das amostras aos 40 dias ($p = 0,035$).....	75
Figura 13	Gráfico da AON comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em mm^2 das amostras aos 7 dias ($p = 0,019$).....	76
Figura 14	Gráfico da AON comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em mm^2 das amostras aos 40 dias ($p < 0,001$).....	76

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela referente aos picos dos elementos cálcio, fósforo e titânio presentes na superfície dos discos selecionados dentre os grupos CTL e ALD.....	78
Tabela 2	Tabela referente aos picos dos elementos cálcio, fósforo e titânio presentes na superfície dos implantes selecionados dentre os grupos CTL e ALD.....	78
Tabela 3	Tabela obtida por análise em goniômetro mostrando dados referentes a maior hidrofília, sublinhados e em negrito, diferenciando os grupos CTL e ALD.....	79
Tabela 4	Tabela demonstrativa relacionando os valores obtidos nas médias de ELCOI e AON.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ALD.....	Grupo Alendronato
AON.....	Área óssea neoformada
CTL.....	Grupo Controle
EDS.....	Espectroscopia por energia dispersiva
ELCOI.....	Extensão linear de contato osso-implante
kg.....	Quilogramas
MEV.....	Microscopia eletrônica de varredura
mg.....	Miligramas
ml.....	Mililitros
mm.....	Milímetros
mm ²	Milímetros quadrados
OC.....	Osteocalcina
RPM.....	rotações por minuto
SBF.....	<i>Simulated Body Fluid</i> (Fluido Corporal Simulado)
TRAP.....	Enzima Fosfatase Ácida Tartarato Resistente

SUMÁRIO

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	23
III. PROPOSIÇÃO	25
III. REVISÃO DA LITERATURA	27
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
1. Materiais	32
1.1 Discos de titânio	32
1.2 Implantes de titânio	32
2. Tratamento Biomimético	33
2.1 Fluido corporal simulado – SBF	33
2.2 Alendronato	35
3. Caracterização Topográfica	35
3.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
3.2 Análise de espectroscopia por energia dispersiva (EDS).....	36
3.3 Molhabilidade	36
4. Experimentação animal.....	37
4.1 Delineamento e Procedimento Cirúrgico.....	37
4.2 Cuidados Pós-Operatórios.....	39
4.3 Eutanásia e Coleta do Material	40
4.4 Processamento das peças	40
4.5 Análise Imunoistoquímica	41
4.6 Análise Histométrica	42
4.6.1 Extensão linear de contato osso-implante.....	42
4.6.2 Área óssea neoformada	43
4.6.3 Análise estatística.....	43
V. RESULTADOS.....	45
1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
2. Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)	46
3. Molhabilidade	47
4. Análise Imunoistoquímica	47
5. Análise Histométrica	49
VI. DISCUSSÃO	50
VII. CONCLUSÃO	55

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
FIGURAS	64
TABELAS	77
ANEXOS	80
Anexo 1 - Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais.....	81
Anexo 2 - Normas IJOMS.....	82

***TRATAMENTO BIOMIMÉTICO DE DISCOS E
IMPLANTES DE TITÂNIO COM ALENDRONATO.
CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA, ESTUDO TOMOGRÁFICO,
HISTOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO EM COELHOS.***

I. INTRODUÇÃO

I. Introdução

A instalação de implantes dentários possui técnica bem estabelecida na literatura, porém dificuldades estruturais anatômicas do paciente podem ser encontradas para tal realização. A pneumatização do seio maxilar é um importante empecilho quando se faz necessária a fixação de implantes em regiões posteriores da maxila¹. A manutenção da arquitetura óssea se dá pela relação entre reabsorção e neoformação óssea local, sendo os osteoclastos e osteoblastos as células que as desempenham. Vários fatores atuam estimulando ou inibindo a função dessas células na remodelação².

Os bisfosfonatos são potentes inibidores da atividade osteoclástica e possuem alta afinidade pela hidroxiapatita, sua interação celular leva os osteoclastos à redução da atividade e apoptose, diminuindo a reabsorção óssea³. O alendronato é um bisfosfonato amplamente utilizado para controle da osteoporose, osteopenias e redução de fraturas ósseas, indicado a pacientes com comprometimento sistêmico promovendo aumento na densidade mineral óssea⁴.

O incentivo à pesquisa assim como a procura por materiais biocompatíveis e técnicas que restabeleçam tecidos perdidos ou comprometidos têm aumentado de forma positiva a gama de biomateriais de alta efetividade⁵. Modificações nas superfícies dos implantes de titânio podem ser realizadas no intuito de aumentar a capacidade de neoformação óssea ao redor das espiras. Várias técnicas são descritas no tratamento biomimético dessas superfícies com resultados satisfatórios^{6,7}.

III. PROPOSIÇÃO

III. Proposição

Avaliar o emprego do alendronato sobre a caracterização topográfica de implantes e discos de titânio *in vitro*, e sobre a superfície de implantes de titânio inseridos em coelhos após levantamento de seio maxilar, correlacionando as respostas biológicas e físicas do tratamento comparadas a protocolos bem estabelecidos da implantodontia.

III. REVISÃO DA LITERATURA

III. Revisão da literatura

O levantamento da membrana sinusal foi descrito por Boyne et al.(1980)¹. O procedimento consiste no acesso a membrana do seio maxilar e elevação da mucosa criando espaço entre o teto da maxila para ganho de estrutura óssea. O tecido ósseo autógeno é dado como padrão ouro para a inserção tanto em defeitos ósseos como nos casos de levantamento do seio maxilar. Como alternativa aos tecidos autógenos, os biomateriais vêm sendo empregados com objetivo de alterar e interagir com o tecido vivo, preenchendo defeitos ósseos, atuando como osteocondutores ou ainda somados a osteoindutores locais⁵.

O alendronato tem sido utilizado na implantodontia tanto de forma sistêmica quanto na forma de aplicação local^{8,9,10}. O emprego do alendronato se dá vinculado ao auxílio no reparo de perdas ósseas periimplantares e periodontais, na aceleração da formação óssea, de forma terapêutica, associada à instalação de implantes dentários, sem apresentar prejuízo para a osseointegração^{9,10,11}.

Duque e Rivas (2007)¹² avaliaram o alendronato (bisfosfonato) sobre a osteoblastogênese, relatando que o alendronato além de induzir a diferenciação dos osteoblastos aumentou a atividade dos mesmos, resultando em mineralização acelerada, observada após duas semanas.

Komatsu et al. (2013)¹³ verificaram maior número de osteoblastos e de atividade osteoblástica em aplicações locais de alendronato, resultando em formação óssea e inibição osteoclástica. Reddy et al. (1995)¹⁴ realizaram estudo em cães onde verificaram aumento da densidade óssea em relação ao grupo controle, quando tratados com o alendronato via oral.

O risco de osteonecrose dos maxilares após procedimentos invasivos em usuários assim como o vínculo do alendronato com perdas de implantes em função, levanta dúvidas quanto ao seu uso¹⁵. A hipótese mais aceita para as osteonecroses advindas do uso dos bisfosfonatos leva em consideração a estagnação dos processos de remodelação óssea fisiológicos¹⁶.

Uma infinidade de substâncias, como os bisfosfonatos, podem ser utilizados associados a implantes de titânio, interagindo a nível celular positivamente, por meio de tratamentos biomiméticos. Abe et al. (1990)¹⁷ desenvolveram inicialmente o método biomimético e permitiram o recobrimento dos materiais com apatitas. A partir disso o método foi sendo alterado conforme novas pesquisas foram criadas tornando o tratamento mais confiável e de prognóstico mais favorável.

Os métodos biomiméticos se mostram efetivos pois imitam com excelência os processos biológicos de neoformação, para tal, se faz necessário o fluido corporal simulado - SBF (*Simulated Body Fluid*), solução aquosa artificial que possui pH e composição química semelhantes ao plasma sanguíneo¹⁸. O SBF contém íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} e HCO_3^- , estes essenciais para a formação de apatitas, como a hidroxiapatita.

Métodos subtrativos são utilizados nos implantes de titânio a fim de se alterar a microestrutura superficial, gerando maior rugosidade superficial, que por fim facilitará a deposição de matriz extracelular durante a osseointegração¹⁹. Dentre os métodos utilizados, as modificações químicas, como a subtração ácida, vieram a se consolidar na literatura por melhorarem a taxa de sucesso dos implantes sem incorporar grãos de partículas ou demais contaminantes²⁰.

A interação das propriedades que os variados métodos de tratamento oferecem, isoladamente, vem a melhorar a previsibilidade da reabilitação com implantes.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV. Material e Métodos

1. Materiais

1.1 Discos de titânio

Foram elaborados 6 (seis) discos de titânio grau IV, de 5 milímetros de diâmetro e 3 milímetros de altura. Os discos foram divididos em 2 grupos de 3 amostras e tratados da seguinte forma:

Grupo CTL: Discos submetidos a subtração ácida;

Grupo ALD: Discos submetidos a tratamento biomimético com alendronato;

Os 6 discos foram direcionados para as análises de caracterização topográfica.

1.2 Implantes de titânio

Foram utilizados, no total, 26 (vinte e seis) implantes dentários de titânio comercialmente puro, cônicos, de plataforma hexágono externo, medindo 3,6 milímetros de diâmetro e 6,5 mm de altura (Linha ATRO - Implalife Indústria de Produtos Médico Odontológicos Ltda, Jales, São Paulo, Brasil).

Seis implantes foram divididos em 2 grupos de 3 amostras para os testes de caracterização topográfica:

Grupo CTL: Implantes submetidos a subtração ácida;

Grupo ALD: Implantes submetidos a tratamento biomimético com alendronato;

Nos testes com animais, 20 implantes foram distribuídos em 2 grupos de 10 amostras:

Grupo CTL: Implantes submetidos a subtração ácida;

Grupo ALD: Implantes submetidos a tratamento biomimético com alendronato;

Discos e implantes não interagiram durante os testes e não foram comparados entre si uma vez que as amostras foram analisadas quanto ao tratamento recebido nas superfícies e a empregabilidade nas diferentes proposições. Os grupos CTL para discos e implantes sofreram subtração ácida utilizando os ácidos nítrico, sulfúrico e clorídrico. As concentrações e tempos de exposição nas soluções constituem segredo de indústria.

Os grupos não foram manipulados previamente aos testes de superfície ou mesmo às fases cirúrgicas respeitando processos comerciais de aplicabilidade.

2. Tratamento Biomimético

2.1 Fluido corporal simulado – SBF

Para a elaboração do SBF colocou-se 500 mililitros água destilada em béquer com capacidade para 1000 mililitros sobre agitador magnético a 175 rotações por minuto (rpm) (TE-0851 - Tecnal Equipamentos para Laboratórios Ltda. Piracicaba, São Paulo, Brasil). Substâncias foram adicionadas isoladamente, até homogeneização, na seguinte ordem: 12,0045 gramas de NaCl, 0,5025 gramas de NaHCO₃, 0,3360 gramas de KCl, 0,2610 gramas de K₂HPO₄, 0,1065 gramas de Na₂SO₄, 60 mililitros de HCl 1 molar, 0,5520 gramas

de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,4575 gramas de $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha). Todos os compostos passaram por pesagem em balança analítica previamente à adição (Ohaus Adventurer AR2140 – Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda. São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil). Após as dissoluções foi adicionada solução tampão Tris (Trizma - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha) suficiente para se alcançasse pH igual 7,4 em pHmetro calibrado (GLP 22 – Crison Instruments S.A. Barcelona, Espanha). Com o pH ajustado, completou-se a solução com água destilada para a formação de cada 1000 mililitros de SBF utilizado.

Parafusos de cobertura foram inseridos nos implantes do Grupo ALD, posteriormente à subtração ácida, e fixados em isopor para flutuação em béquer sem contato com o imã responsável pela agitação da solução. Esta disposição facilitou com que a solução entrasse em contato com toda a porção ativa (osseointegrável) dos implantes. Da mesma forma, os 3 discos do Grupo ALD foram colocados nos bordos do béquer e, portanto, foram avaliados apenas na superfície lisa superior que esteve em contato direto com a solução uma vez que não são passíveis de fixação.

Ambos os materiais foram submersos primeiramente em água oxigenada a 10 volumes por 24 horas em agitador magnético a 175 rpm, em seguida foram lavados com soro fisiológico estéril 0,9% e secados em estufa a 37°C por 24 horas.

Em béqueres separados tanto implantes quanto discos secos foram imersos em 200 mililitros de SBF, em rotação lenta o suficiente para se evitar deposição dos sais ao fundo (175 rpm), por 24 horas a 37°C em agitador magnético (752A - Fisatom Equipamentos Científicos Ltda. São Paulo, São

Paulo, Brasil). Após o processo, os materiais foram levados à estufa por 24 horas para secagem a 37°C.

2.2 Alendronato

Praticou-se no presente estudo a dose de 40 mg por implante ou disco em solução de 0,5 mg de alendronato por mililitro (ml) de SBF. Cada amostra dos grupos ALD foi submersa em 80 ml de solução homogênea de SBF e alendronato de sódio, submetida à agitação de 175 rpm, durante 24 horas, a 37°C. Os materiais foram retirados da solução e mantidos em estufa a 37°C por 24 horas. A secagem lenta, passiva e total em estufa visa a melhor deposição da camada de íons sobre as superfícies. Três implantes e três discos foram separados para as análises topográficas, e outros 10 implantes para a experimentação animal, constituindo os grupos ALD.

Todos os implantes foram esterilizados por meio de irradiação por raios gama e acondicionados individualmente para a fixação nos espécimes animais.

3. Caracterização Topográfica

3.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Três discos e três implantes constituintes de cada grupo foram submetidos à análise de fotomicrografias ao microscópio eletrônico. As análises qualitativas se deram nas regiões apical, terço médio e cervical dos implantes, e na região central dos discos, dadas as zonas de diferentes anatomias e os comportamentos dos materiais frente a topografia. Nesta análise, utilizou-se

microscópio eletrônico de varredura (EVO/LS 15 - Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemanha) operando com feixe de elétrons de 20kV nas magnificações de 500, 1000, 5000 e 10000x.

3.2 Análise de espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

Os mesmos implantes e discos submetidos ao MEV foram analisados por espectroscopia por energia dispersiva (EDS) utilizando espectrômetro (INCA X-act Energy 250, Oxford Instruments, Abingdon - Oxfordshire, Reino Unido) acoplado ao microscópio. Realizou-se análise da variação química e quantificação em pontos padronizados, principalmente, dos elementos cálcio, fósforo e titânio.

3.3 Molhabilidade

Com o emprego de um goniômetro (DSA 100 - Krüss GmbH. Hamburgo, Alemanha) foram realizadas mensurações dentre os 2 grupos de discos tratados. Foram mensurados o ângulo de contato com a água, a energia livre de superfície e a presença de sítios doares de elétrons (base de Lewis), a fim de se relacionar materiais de menor hidrofobicidade, e portanto, maior propensão à adesão celular. O goniômetro utilizado pipeta a gota de água destilada para análise, assim como as gotas de etilenoglicol e diiodometano em momentos distintos. Os cálculos e demais dados são gerados pela interação entre software (DSA4 - Krüss GmbH. Hamburgo, Alemanha) e câmera do próprio aparelho. Implantes não foram utilizados neste teste dada sua incompatibilidade de superfície.

4. Experimentação animal

4.1 Delineamento e Procedimento Cirúrgico

Foram utilizados para a realização deste estudo 20 (vinte) coelhos da raça Nova Zelândia, “*albinus*”, machos, adultos com idade aproximada de 5 (cinco) meses e peso corporal entre 3 a 4 Kg. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, UNESP, acomodados no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP, mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, sendo alimentados com ração sólida padrão (Procoelho, Primor, Jaguaré, São Paulo, Brasil) e água “*ad Libitum*” durante todo o experimento. Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-UNESP pelo processo FOA nº 2014-00891 (ANEXO 1).

Inicialmente os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 8 horas. A sedação se iniciou por administração via intramuscular de cloridrato de cetamina a 1% (Vetaset, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 60mg/quilograma (mg/kg), e do cloridrato de xilazina a 2% (Dopaser, Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), à 5mg/kg. Foi realizada complementação anestésica por infiltração de solução de cloridrato de mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100, DFL Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 ml/Kg na linha mediana do dorso nasal. Semelhante em humanos, os animais tiveram os seios maxilares acessados

unilateralmente, submetidos à manobra de elevação das membranas sinusais e divididos igualmente (10 amostras/grupo) conforme o tipo de tratamento recebido pelo implante a ser instalado:

Grupo CTL: Implantes submetidos a subtração ácida;

Grupo ALD: Implantes submetidos a tratamento biomimético com alendronato;

Os seios maxilares foram randomizados para as inserções dos tratamentos, princípios de biossegurança foram mantidos e os procedimentos foram realizados por um único operador.

Para acesso ao osso nasal se realizou tricotomia e antissepsia do dorso nasal por fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrolidona Iodo com 1% de iodo ativo degermante (PVP-I - Riodeine Dermo Suave Degermante, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) associado ao PVP-I Tópico com 1% de iodo ativo (PVP-I - Riodeine Dermo Suave Tópico, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil). O protocolo cirúrgico utilizado para o acesso a cavidade sinusal do animal foi o estabelecido por Asai, Shimizu e Ooya (2002)²¹. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu- Friedy, Alemanha), uma incisão linear de 5 cm foi feita na linha mediana do dorso nasal. A pele e o periósteo foram cuidadosamente descolados e devidamente afastados com um descolador tipo molt (Hu-Friedy, Alemanha) o suficiente para a exposição do osso nasal e da sutura nasoincisa. Após a exposição, uma janela circular de 3 mm de diâmetro foi confeccionada unilateralmente, demarcando a área, utilizando broca trefina (Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil). Todos os acessos se fizeram paralelos à linha mediana do dorso

nasal, a 2 cm anteriores da sutura nasofrontal e a 1 cm lateral da linha média (Figura 1a, b, c). Todas as osteotomias foram realizadas sob abundante irrigação com solução fisiológica estéril a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil). Utilizou-se broca diamantada esférica nº 1011 (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil) para a finalização das osteotomias com contra-ângulo redutor 20:1 (Kavo do Brasil, Joinville, Brasil) em motor elétrico (BLM 600 plus, Driller, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm. A membrana sinusal foi descolada e elevada com curetas para seio (Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil) visando a integridade da mesma (Figura 1d, e, f). Os implantes dos grupos CTL e ALD, previamente tratados, foram inseridos, os parafusos de cobertura foram instalados, o retalho total foi reposicionado e a sutura realizada com fio de náilon 4-0 (Mononylon 4-0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples (Figura 1g, h, i).

4.2 Cuidados Pós-Operatórios

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de 0,1ml/Kg de pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil) em dose única e 1mg/Kg/dia de dipirona sódica (D-500 Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda, São Paulo, Brasil), se estendendo nos 2 próximos dias. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP nas mesmas circunstâncias que se encontravam previamente ao procedimento cirúrgico, até a eutanásia animal, que se deu com 7 e 40 dias pós-operatórios.

4.3 Eutanásia e Coleta do Material

A sedação se deu pela administração via intramuscular de cloridrato de cetamina a 1% (Vetaset, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 60mg/Kg, e do cloridrato de xilazina a 2% (Dopaser, Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), à 5 mg/Kg. A eutanásia ocorreu por meio de perfusão no ventrículo esquerdo de 150 ml de solução salina fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 minutos, seguida de 1800ml de Formaldeído 4% (Paraformaldeído 4%, Acros Organics, Nova Jersey, Estados Unidos) durante 40 minutos, usando uma bomba perfusora peristáltica (Masterflex L/S, Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, Estados Unidos) na velocidade de 45ml/minuto. Os períodos de eutanásia ocorreram aos 7 e 40 dias após o procedimento de elevação da membrana do seio maxilar e instalação dos implantes. Após a eutanásia, o complexo nasal incluindo as cavidades sinusais foram removidos em bloco.

4.4 Processamento das peças

Em um espaço de 48 horas, os blocos se mantiveram em formol 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) para a fixação, foram posteriormente lavados em água deionizada corrente por 24 horas, e submetidos a descalcificação em temperatura ambiente em EDTA 20% (Ácido Etileno Diamino Tetracético, Merck & Co, Inc, Nova Jersey, Estados Unidos) com trocas semanais até a descalcificação completa. Em seguida o material foi lavado em água deionizada corrente por 24 horas, e desidratado por

sequência de álcoois: 70% (por 6 horas), 80% (por 13 horas), 90% (por 1 hora), 95% (por 1 hora), 100% 1 (por 1 hora), 100% 2 (por 1 hora), 100% 3 (por 1 hora). Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol (álcool/xilol por 30 minutos), seguido de xilol-1 (por 45 minutos) e xilol-2 (por 45 minutos), para posterior inclusão em parafina. Passadas por parafina-1 (por 90 minutos), parafina-2 (por 90 minutos) e parafina-3 (por 90 minutos), as peças foram incluídas. Após 24 horas, os implantes foram removidos dos blocos por aquecimento do parafuso de cobertura, novamente banhados em parafina-3 até que se derretessem os remanescentes da última inclusão, sendo incluídos por fim. Cortes de 6 µm de espessura foram obtidos e montados em lâminas de vidro onde cada lâmina apresentou de 2 a 3 cortes.

4.5 Análise Imunoistoquímica

Com o objetivo de analisar respostas celulares quanto ao processo de mineralização e reabsorção óssea, foram utilizados os anticorpos primários contra osteocalcina (SC18319) e TRAP (SC30832) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos). A imunoperoxidase foi o método de detecção utilizado para os experimentos. O anticorpo secundário utilizado foi o biotilado anti-cabra produzido em burros (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Estados Unidos), o amplificador do sinal da marcação foi a Avidina Biotina (Kit Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos) e o cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (Dakocytomation, Carpinteria, CA, Estados Unidos).

A análise foi realizada por um único operador, em microscópio óptico (DM LB, Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suíça), em ampliações de 4x, 10x, 25x e 40, sobre os tecidos que estiveram em íntimo contato com o implante. Uma avaliação semiquantitativa atribuiu escores para as expressões das proteínas, de acordo com o número de células imunomarcadas, nas regiões onde houve remodelação óssea: marcação leve, marcação moderada e marcação intensa. Estes se deram por marcações positivas da diaminobenzidina e por controles negativos, observado a dinâmica do tecido ósseo.

Para esta análise, foram comparados os grupos CTL e ALD entre 7 e 40 dias.

4.6 Análise Histométrica

4.6.1 Extensão linear de contato osso-implante

A extensão linear de contato osso-implante (ELCOI) foi avaliada por meio de lâminas coradas com hematoxilina e eosina - HE (Merck & Co, Inc, Nova Jersey, Estados Unidos), submetidas à análise em microscópio óptico (DM4000B, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemanha) em ampliação de 2,5x, este conectado a um computador, onde se realizou a obtenção e análise das fotomicrografias por meio de software (AxioVision 4.8, Imaging Associates Ltd, Carl Zeiss Group, Jena, Alemanha). A ELCOI foi mensurada a partir da primeira espira registrada no tecido a partir da margem

óssea. As mensurações lineares se deram em mm e se diferenciaram por medidas de tecido ósseo e medidas de tecido mole.

4.6.2 Área óssea neoformada

Para mensurar a área óssea neoformada (AON), a área da quarta espira de cada implante foi obtida em microscópio óptico (DM LB, Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suíça) em magnificação de 250x, acoplado a uma câmera de captação de imagem (DC 300F, Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suíça). Para esta análise também se diferenciou tecido mole e ósseo, em mm², envolvendo a quarta espira.

O software ImageJ (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, EUA) foi utilizado na obtenção dos valores numéricos para as duas mensurações, após calibração, visando análise estatística.

4.6.3 Análise estatística

A análise estatística foi conduzida por meio da comparação entre os grupos CTL e ALD, nos períodos de 7 e 40 dias, dentre as mensurações de ELCOI e AON. As amostras foram submetidas ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov resultando em distribuição normal e, portanto, em dados paramétricos. A análise de variância utilizada foi two-way ANOVA e como pós-teste o método Holm-Sidak.

Os testes foram conduzidos por meio de software SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc, San Jose, CA, Estados Unidos).

V. RESULTADOS

V. Resultados

1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Dadas as ampliações de 500, 1000, 5000 e 10000x para os discos e implantes submetidos aos tratamentos de superfície, observou-se diferença na comparação das imagens representativas de ambos os grupos. Uma imagem referente a cada região foi selecionada aleatoriamente para comparação.

Nos discos, notou-se que a porosidade superficial foi preservada em todas as ampliações. Contudo, temos uma deposição superficial por cristais maior no grupo ALD, visualizadas nas ampliações de 500 e 1000x, em relação ao grupo CTL (Figura 2).

Mesmo sendo os implantes analisados nos terços cervicais, médios e apicais, as propriedades e aspectos observados sobre as superfícies implantares corroboram com aquelas encontradas nos discos. Percebeu-se que os grupos ALD possuem maior adesão de cristais, superfície menos nítida nas maiores ampliações, com destaque para os terços apicais. As análises qualitativas sugeriram recobrimento superficial pelas substâncias envolvidas nas etapas do tratamento biomimético dos grupos ALD, sendo a região apical a mais envolvida (Figuras 3, 4 e 5).

2. Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

Os grupos CTL contendo discos e implantes submetidos à subtração ácida apresentaram quase totalidade da superfície recoberta apenas por titânio, verificando percentual de peso do elemento próximo a 100% da amostra. Já os

grupos ALD, para discos e implantes, apresentaram variados elementos dispostos superficialmente (Tabelas 1 e 2). Os discos ALD somaram 0,22% de peso de íons cálcio e 0,31% de fósforo à sua estrutura. Os implantes tratados do grupo ALD, por sua vez, ganharam 0,54% de peso de cálcio e 0,98% de fósforo, uma vez que estes elementos não foram observados nos grupos CTL (Figura 6).

3. Molhabilidade

Conceitos resultantes dos trabalhos bem aceitos de Van Oss (1993)²², Knorr et al. (2005)²³ e Rüttermann et al. (2011)²⁴, foram utilizados na caracterização dos tratamentos durante a análise dos dados.

O grupo ALD apresentou ângulo de contato com a água de 81,4°, enquanto o grupo CTL possuía ângulo de 100,4°. Sendo tal grandeza a mais confiável, dados os materiais em uso, pode-se dizer que o grupo ALD é o mais hidrofílico produzido neste experimento.

Analisando os dados de energia de superfície (γ_s) e base de Lewis (γ_s^-), pode-se afirmar que o grupo ALD ainda tem maior probabilidade de adesão celular em sua superfície (Tabela 3).

4. Análise Imunoistoquímica

As imunomarcações foram avaliadas na região de tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes e com o objetivo de caracterizar as etapas de formação/mineralização óssea (osteocalcina) e reabsorção/atividade

osteoclástica (TRAP). A osteocalcina se apresentou marcada em osteoblastos na etapa final de mineralização, caracterizando um tecido ósseo mais maduro.

Aos 7 dias foi possível observar a presença de marcação positiva para osteocalcina na matriz extracelular do tecido ósseo, marcando células do tecido conjuntivo e possivelmente em atividade de diferenciação osteoblástica. O tecido junto às espiras dos implantes apresentou importante marcação para esta proteína. Em alguns pontos, onde foi possível visualizar discreta formação de tecido ósseo, a osteocalcina estava presente tanto em precipitação sobre a matriz como também nas células osteoblásticas ao redor do tecido ósseo. Maior marcação foi notada no grupo ALD. Aos 40 dias foi possível observar o tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes com marcação moderada para osteocalcina, onde se apresentou precipitada sobre o tecido ósseo avaliado igualmente em CTL e ALD (Figura 7).

A TRAP esteve marcada positivamente em osteoclastos, sendo, portanto, um marcador da reabsorção do tecido ósseo. Aos 7 dias foi possível observar alguns osteoclastos marcados positivamente para esta proteína, junto ao tecido ósseo. Aos 40 dias, foi possível visualizar tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes e em alguns pontos, observou-se discreta marcação positiva para TRAP, evidenciando discreta atividade osteoclástica nas regiões avaliadas em CTL e ALD (Figura 8).

Dentre os escores predominantes temos: discreto nas análises por osteocalcina em 7 dias para o grupo CTL (em tecido conjuntivo e em tecido ósseo primário); moderado a intenso nas análises por osteocalcina em 7 dias para o grupo ALD (em tecido conjuntivo e em tecido ósseo primário); moderado nas análises por osteocalcina em 40 dias para CTL e ALD (no tecido ósseo junto

às espiras dos implantes); discreto nas análises por TRAP em 7 e 40 dias, igualmente para CTL e ALD (em osteoclastos próximos ao tecido ósseo em 7 dias e em osteoclastos próximos ao tecido ósseo neoformado em 40 dias).

5. Análise Histométrica

As análises estatísticas visaram principalmente correlacionar os dados sobre o tecido ósseo neoformado nos prazos de 7 e 40 dias (Figuras 9 e 10). As mensurações geraram valores reais durante a análise histométrica de ELCOI e AON, tanto para tecido ósseo quanto para tecido mole (Tabela 4). Na comparação da ELCOI entre os grupos CTL e ALD aos 7 dias, para tecido ósseo, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,757$) (Figura 11). Já no período de 40 dias os valores de ELCOI para ALD foram superiores e se mostraram significantes estatisticamente ($p = 0,035$) (Figura 12). Nas comparações de AON entre CTL e ALD para 7 dias, o grupo CTL se mostrou com maior quantidade óssea estatisticamente ($p = 0,019$) (Figura 13). Já aos 40 dias, pode-se constatar que as áreas de tecido ósseo neoformadas dos grupo ALD foram significantemente maiores que as áreas de CTL ($p < 0,001$) (Figura 14).

VI. DISCUSSÃO

VI. Discussão

Os resultados obtidos pelas análises de superfície nos direcionam para o tratamento que pode oferecer melhor resposta frente aos primeiros estágios da osseointegração, atendendo necessidades físico-químicas das interações a nível celular.

O processo de neoformação óssea se revela dependente da estrutura química e topográfica do material sujeito à interação. Superfícies submetidas a subtração ácida ou tratamentos que aumentem a superfície de contato osso/implante aumentam a chance de adesão celular assim como a deposição de matriz extracelular^{25,26}, reforçando as evidências aqui formuladas.

Yaffe et al. (2003)²⁷ pesquisaram o uso do alendronato em administrações intravenosas em animais, concluíram que o uso é efetivo no controle da reabsorção óssea assim como os dados obtidos neste trabalho. Meraw et al. (1999)⁸ relataram aumento da densidade óssea ao redor de implantes no uso sistêmico do alendronato, dessa forma a proposta da criação de implantes e biomateriais que o tenham disponível deve ser acreditada.

Segundo Binderman, et al. (2000)²⁸ e Gupta, et al. (2011)²⁹, a dose ideal para aplicação tópica do alendronato é de 200µg viáveis no sítio de inserção. Verzola et al. (2015)³⁰ utilizou a dose de 1 mg/kg/semana em ratos Wistar. Tendo em vista a boa resposta frente aos testes deste trabalho, *in vitro* e *in vivo*, buscase aferir a quantidade mais eficaz de alendronato a ser disponibilizada na superfície dos implantes, dadas as doses trabalhadas na literatura, visando ganho na neoformação.

A dose preventiva de alendronato de sódio para osteoporose é de 5 miligramas (mg) diárias ou de 35 mg semanais, já aqueles em fase de tratamento fazem uso de 10 mg diárias ou 70 mg semanais tomadas em uma única dose³¹. Dentro das doses comumente administradas, levando em consideração que uma nova dose não será praticada ao fim da meia vida do alendronato, praticou-se a dose de 40 mg por implante ou disco em solução de 0,5 mg de alendronato por mililitro de SBF. Estudos posteriores ao presente com doses alternativas podem apresentar respostas teciduais diferentes dada a quantidade de sal viável no sítio cirúrgico.

Nos trabalhos de Lin e colaboradores (1999)³², ficou evidente que o alendronato, após absorvido pelo tecido ósseo, fica em direta interação e tem lenta eliminação pelo organismo. Constatou-se que, após a descontinuação da terapia, os bisfosfonatos permaneceram cerca de 200 dias no organismo em ratos, 3 anos em cães e até 12 anos para eliminação total em humanos. Nesta intenção, propriedades tardias como o índice reabsortivo podem se apresentar menores nos pacientes que instalarmos implantes submetidos ao tratamento biomimético com alendronato.

A busca por íons cálcio e fósforo no EDS se baseia no comportamento de ambos os elementos. Estes formam os fosfatos de cálcio, que apresentam passividade e boa interação a nível celular quando indicados para as reconstruções ósseas³³. Os resultados quantitativos do EDS se mostraram fiéis quanto ao tratamento proposto para cada material, determinando peso dos elementos incorporados, relacionando-os com a matéria-prima. Os resultados deste teste sugerem que o tratamento biomimético com alendronato propicia a

formação de apatitas sobre a superfície do implante *in vitro*, o que pode vir a somar nos estágios de neoformação.

Propriedades como hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, topografia, energia de superfície e composição química atuam diretamente sobre o comportamento celular ao redor dos materiais. A adesão celular se faz melhorada quando componentes do soro sanguíneo estão presentes no momento do acesso, alterando a hidrofobicidade dos implantes^{34,35}.

Lee et al. (1998)³⁶ testaram superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas com diferentes percentuais de molhabilidade, variando de 43° a 96°, na tentativa de adesão de células ovarianas, fibroblastos, células endoteliais e proteínas do soro bovino. Observaram que a maior adesão e crescimento celular se deu nas regiões hidrofílicas com ângulos de contato de 57° com a água. Vogler (1998)³⁷ considerou hidrofílicas suas amostras que estiveram abaixo de 65° de ângulo de contato. O melhor percentual obtido neste trabalho foi de 81,4° do grupo ALD, valores estes mais próximos dos trabalhos referidos que os apresentados pelo grupo controle.

Não há consenso na literatura que dê de forma absoluta um dado número de graus que torne um ângulo de contato totalmente hidrofílico, ou demais quantificação de energia, frente todos os materiais. Knorr et al. (2005)²³ e Rüttermann et al. (2011)²⁴ utilizaram a energia de superfície (γ_s) para determinar a hidrofobicidade de suas amostras, determinando que dados abaixo de 30 mN/m (milinewton-metro) têm baixa probabilidade de adesão celular. Já Van Oss (1993)²² considerou que valores das bases de Lewis (γ_s) abaixo de 28.5 mN/m tem probabilidade de adesão próximo a zero. Partindo dos princípios supracitados o grupo ALD foi o que apresentou dados mais próximos, dentre as

três grandezas físicas, porém sem atingir os valores especificados pelos autores como ideais.

Vários fatores intrínsecos ainda fazem parte dos processos de deposição de matriz óssea, remodelação e na aceleração das etapas iniciais de neoformação óssea. A análise imunoistoquímica permitiu avaliar marcadores importante nestes processos. A presença discreta do TRAP no período final avaliado se refere a baixa reabsorção óssea no momento testado, fator que pode estar relacionado ao uso de um bisfosfonato à nível local. Os valores intensos de osteocalcina na fase de 7 dias sugerem uma atividade celular propícia à neoformação.

As análises das médias mostraram maior quantidade tecido ósseo em contato com os implantes e da área da quarta espira aos 7 dias para os grupos controle. Variabilidade anatômica do animal, espessura de lâmina óssea nasal, integridade dos cortes histológicos e técnica cirúrgica podem ser os fatores responsáveis das menores médias dos grupos ALD em 7 dias. Entretanto, aos 40 dias, mesmo com médias iniciais menores, os grupos ALD obtiveram neoformação percentual superior aos grupos CTL, ultrapassando também os valores absolutos.

Obteve-se diferença estatística entre os grupos de 40 dias quando comparados. Os Grupos ALD foram superiores aos grupos CTL tanto em área óssea neoformada quanto em recobrimento linear de tecido ósseo.

Verzola et al. (2015)³⁰, após estudo em 160 ratas, concluíram que o uso do alendronato associado à fixação de implantes acelerou o processo de reparo em relação ao grupo controle, aumentou o grau de mineralização ao redor dos

implantes e do osso nas proximidades obtendo homogeneidade, sendo eficaz no aumento da densidade mineral óssea dos espécimes. Dados que corroboram com este estudo realizado em coelhos.

VII. CONCLUSÃO

VII. Conclusão

Foi possível concluir que os tratamentos de superfície de implantes são válidos uma vez que, frente aos testes realizados, tendem a melhorar a interação dos mesmos a nível celular dos indivíduos. Apesar da diferença de comportamento dos materiais, os espécimes tratados com alendronato mostraram ótimos resultados, frente aos testes de caracterização topográfica, àqueles do grupo controle. Os testes *in vitro* são de suma importância previamente aos estudos *in vivo* uma vez que a determinação dos protocolos, doses e resposta dos materiais depende da disponibilidade das soluções que serão absorvidas. Pode-se dizer que os tratamentos biomiméticos com alendronato foram efetivos em acelerar o grau de mineralização óssea, em fornecer aumento da quantidade óssea no local da implantação, porém, na dosimetria aplicada, não atingiu padrões ideais quanto aos ensaios de caracterização topográfica.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. Referências Bibliográficas

1. Boyne PJ, James RA, Linda L. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. J Oral Surg 1980; 38: 613-616.
2. Ruggiero SL, Carlson ER, Assael LA. Comprehensive review of bisphosphonate therapy: implications for the oral and maxillofacial surgery patient. J Oral Maxillofac Surg 2009;67(5):1.
3. Fleisch H. Development of bisphosphonates. Breast cancer research: BCR 2002; 4(1): 30-34.
4. Watts NB, Diab DL. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95(4):1555-65.
5. Figueira Júnior HC, Camarini ET, Pavan AJ, Zanoni JN. Substitutos ósseos equino e bovino associados ou não ao PRP em cavidades mandibulares de cães Beagle: estudo split-mouth qualitativo. ImplantNews 2014; 11(2): 239-243.
6. Lin C, Yen S. Biomimetic growth of apatite on electrolytic TiO₂ coatings in simulated body fluid. Materials Science and Engineering 2006; 26: 54-64.
7. Sato M, Grasser W. Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. J Bone Miner Res 1990; 5(1):31-40.

8. Meraw S, Reeve CM, Wollan PC. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. *J. Periodontol* 1999; 70(2): 151-8.

9. Åstrand J, Aspenberg P. Reduction of instability-induced bone resorption using bisphosphonates. *Acta Orthop Scand* 2002; 73:24-30.

10. Bell NH, Bilezikian JP, Bone III HJ, Kaur A, Maragoto A, Santora AC. Alendronate increases bone mass and reduces bone makers in postmenopausal african-american women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2792-7.

11. Brunsvold MA, Chaves ES, Kornman SK, Aufdemorte TB, Wood R. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontol* 1992; 63:825-30.

12. Duque G, Rivas D. Alendronate has an Anabolic Effect on Bone Through the Differentiation of Mesenchymal stem cells. *journal of bone and mineral research*. 2007; 22(10): 1603-1611.

13. Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Wada S, Ideno H, Nakashima K, et al. Alendronate promotes bone formation by inhibiting protein prenylation in osteoblasts in rat tooth replantation model. *The Journal of endocrinology* 2013; 219(2):145-58.

14. Reddy MS, Weatherford TW, Smith CA, Wes BD, Jeffcoat MK, Jacks TM. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol* 1995; 66: 211-7.

15. Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z, Palumbo C, Ragazzo M, Ferrari F, Tregnaghi A, Pietrogrande F, Procopio O, Saia G, Ferretti M, Bedogni G, Chiarini L, Ferronato G, Ninfo V, Lo Russo L, Lo Muzio L, Nocini PF. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008 Mar; 105(3):358-64.

16. Mashiba T, Turner CH, Hirano T, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. Bone 2001; 28(5):524-31.

17. Abe Y, Kokubo T, Yamamuro T. Apatite coatings on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. J. Mater Sci Mater Med 1990; 1(4):233-238.

18. Kokubo T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. Acta Mater 1998; 46(7): 2519-2527.

19. Lang, NP, Jepsen, S, Working G. Implant surfaces and design (Working Group 4). Clin Oral Implants Res 2009; 20(4):228-231.

20. Xavier SP, Carvalho PS, Beloti MM, Rosa AL. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. J Dent. 2003; 31:173–180.

21. Asai S, Shimizu Y, Ooya K. Maxillary sinus augmentation model in rabbits: effect of occluded nasal ostium on new bone formation. Clin Oral Implants Res 2002; 13:405-409.

22. Van Oss CJ. Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1993; 78:1-49.
23. Knorr SD, Combe EC, Wolff LF, Hodges JS. The surface free energy of dental gold-based materials. *Dental Materials* 2005; 21:272–277.
24. Rüttermann S, Trellenkamp T, Bergmann N, Raab WH, Ritter H, Janda R. A new approach to influence contact angle and surface free energy of resin-based dental restorative materials. *Acta Biomater* 2011 Mar; 7(3):1160-1165.
25. Zhao G, Zinger O, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan BD. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17:258-264.
26. Zhao G, Raines AL, Wieland M, Schwartz Z, Boyan BD. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials* 2007; 28:2821-2829.
27. Yaffe A, Kollerman R, Bahar H, Binderman I. The influence of alendronate on bone formation and resorption in rat ectopic bone development model. *J.Periodontal* 2003; 74:44-50.
28. Binderman I, Adut M, Yaffe A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. *J Periodontol* 2000; 71:1236-40.

29. Gupta J, Gill AS, Sikri P. Evaluation of the relative efficacy of an alloplast used alone and in conjunction with an osteoclast inhibitor in the treatment of human periodontal infrabony defects: A clinical and radiological study. *Indian J Dent Res* 2011 Mar-Apr;22(2):225-31.

30. Verzola MHA, Frizzera F, de Oliveira GJPL, Pereira RMR, Rodrigues-Filho UP, Nonaka KO, Orrico SRP. Effects of the long-term administration of alendronate on the mechanical properties of the basal bone and on osseointegration. *Clin Oral Impl Res* 2015; 26(12):1466–1475.

31. Peters ML, Leonard M, Licata AA. Role of alendronate and risedronate in preventing and treating osteoporosis. *Cleve Clin J Med*. 2001; 68(11): 945-51.

32. Lin JH, Russell G, Gertz B. Pharmacokinetics of alendronate: an overview. *Int J Clin Pract Suppl* 1999; 101:18-26.

33. Kawachi, EY, Bertran CA, Reis RR, Alves OL. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quím. Nova* [online] 2000; 23(4)518-522.

34. Harnett EM, Alderman J, Wood T. The Surface Energy of Various Biomaterials Coated with Adhesion Molecules used in Cell Culture, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2007; 55:90-97.

35. De Bartolo L, Morelli S, Bader A, Drioli E. Evaluation of cell behavior related to physico-chemical properties of polymeric membranes to be used in bioartificial organs. *Biomaterials* 2002 Jun; 23(12):2485–2497.

36. Lee JH, Khang G, Lee JW, Lee HB, Interaction of different types of cells of polymer surfaces with wettability gradient. *J Colloid Interface Sci* 1998; 205(2):323–330.

37. Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* 1998; 74:69-117.

FIGURAS

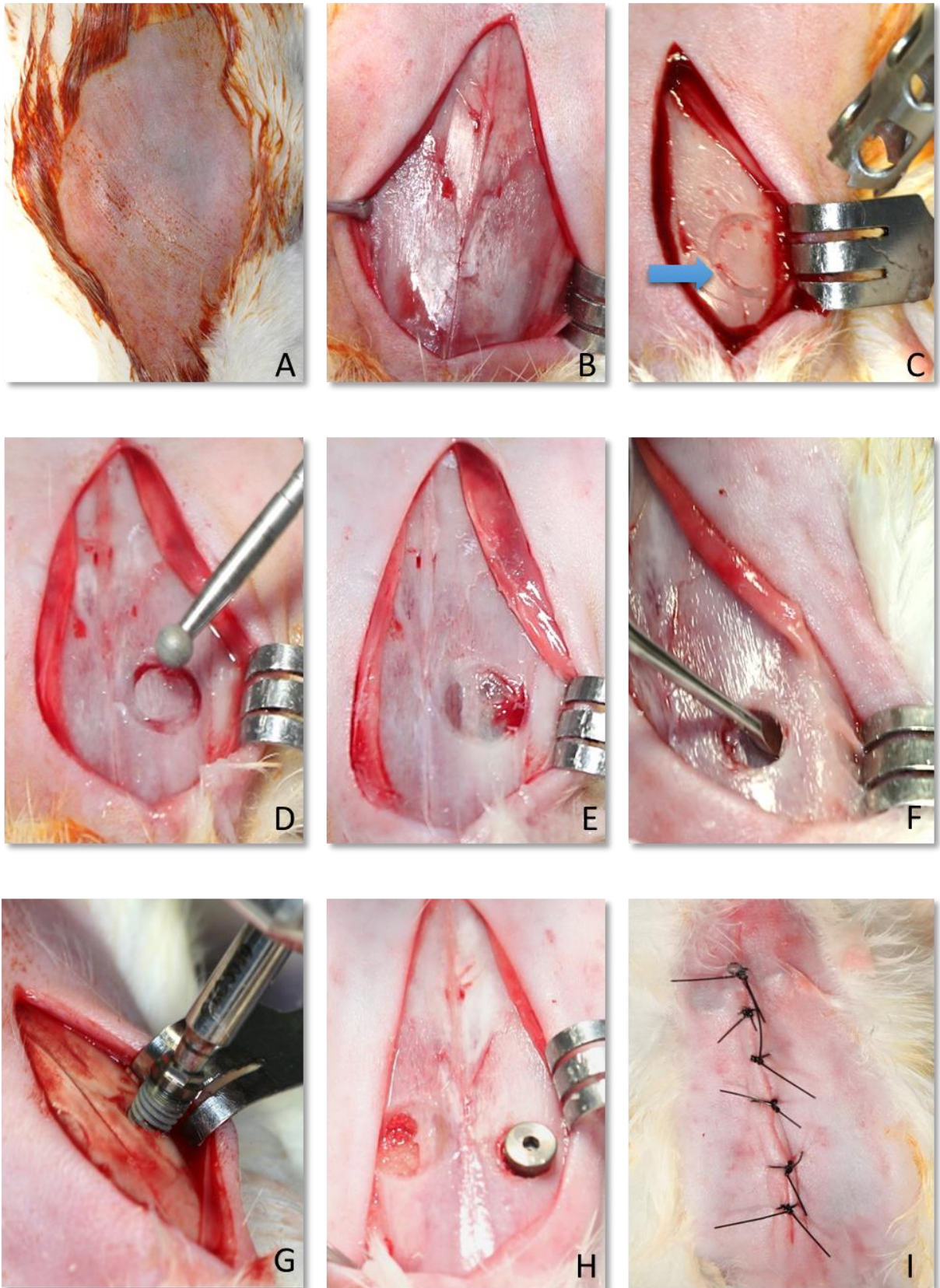


Figura 1 – Etapas do procedimento cirúrgico. (a, b) Exposição do dorso nasal e acesso à parede óssea; (c, d, e) Osteotomias para preparo da janela cirúrgica; (f, g, h) Levantamento da membrana sinusal, instalação do implante e do parafuso de cobertura; (i) Sutura.

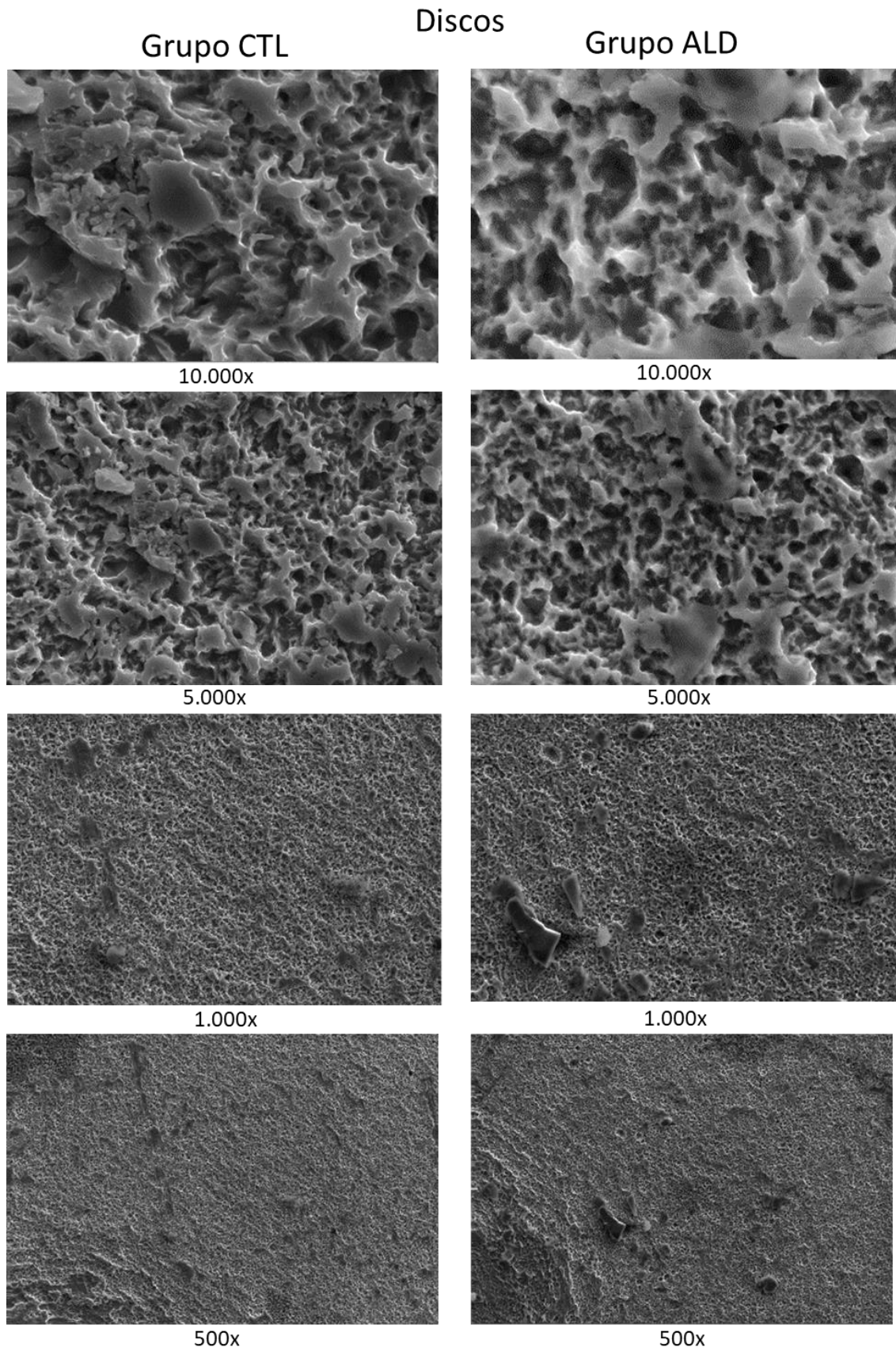
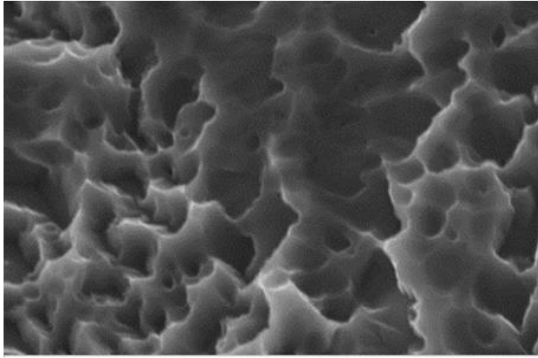


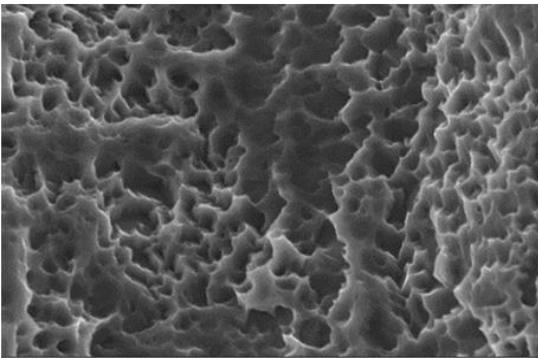
Figura 2 – Imagens representativas dos discos submetidos aos tratamentos nas magnificações de 500, 1000, 5000 e 10000x em MEV.

Implantes – Terço Cervical

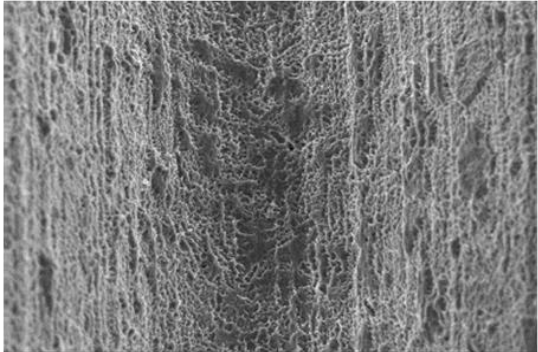
Grupo CTL



10.000x



5.000x

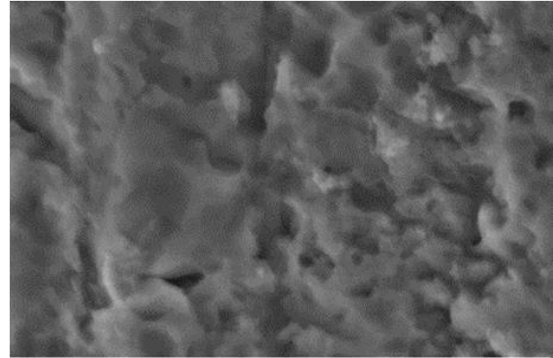


1.000x

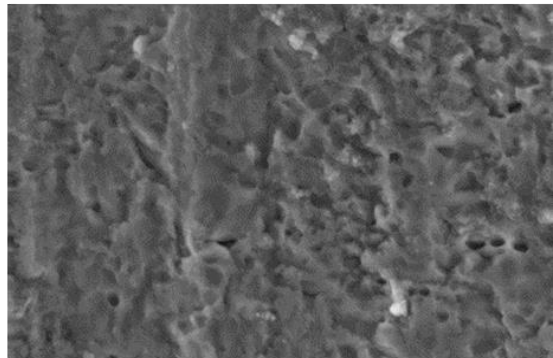


500x

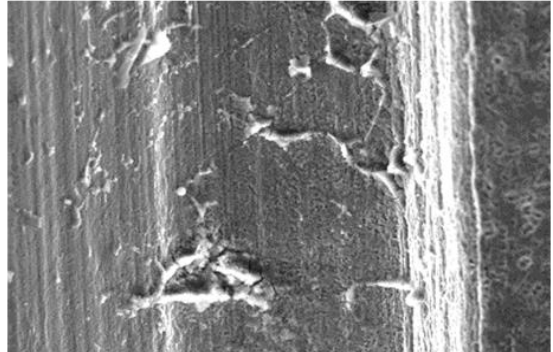
Grupo ALD



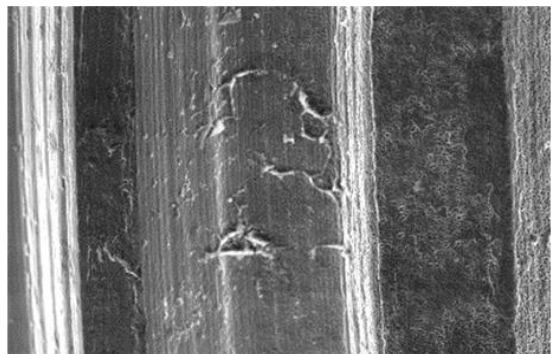
10.000x



5.000x



1.000x

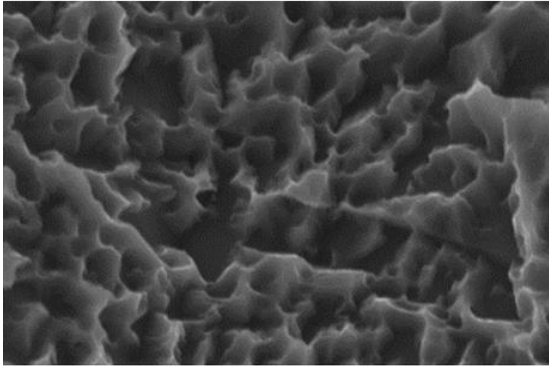


500x

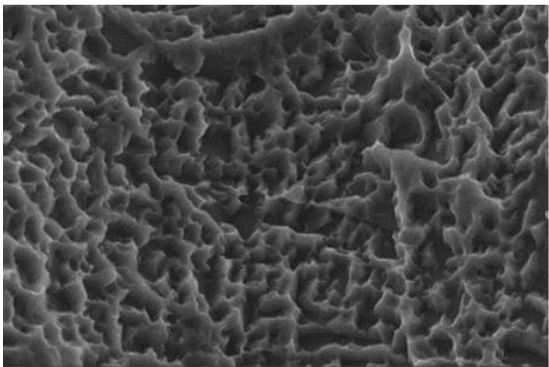
Figura 3 – Imagens representativas dos terços cervicais dos implantes submetidos aos tratamentos nas magnificações de 500, 1000, 5000 e 10000x em MEV.

Implantes – Terço Médio

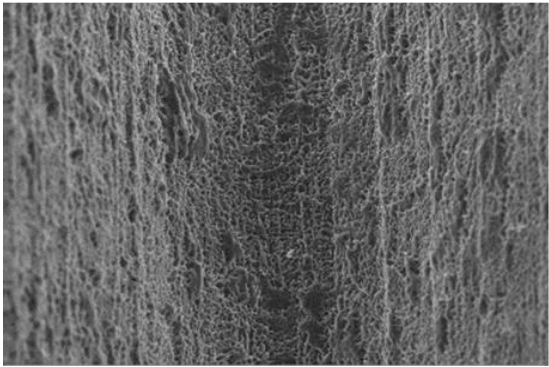
Grupo CTL



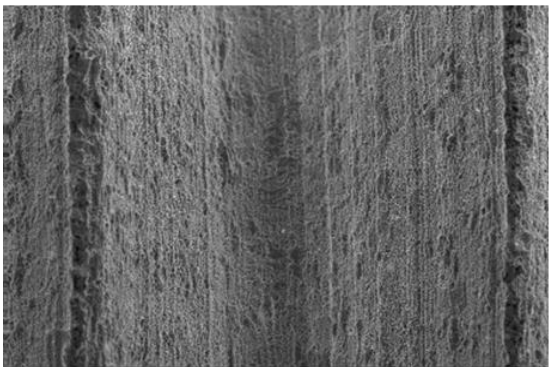
10.000x



5.000x

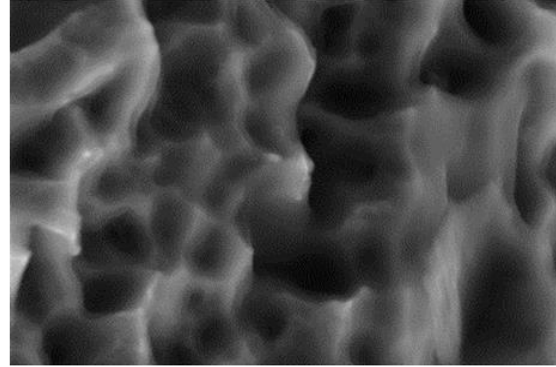


1.000x

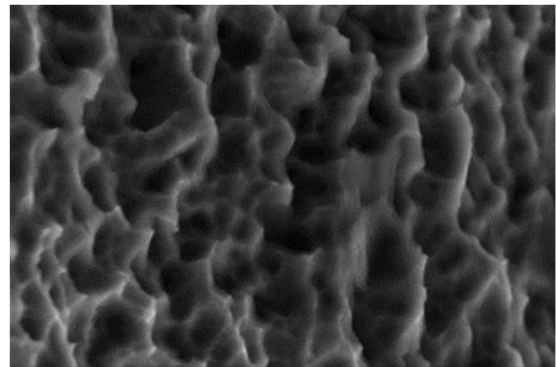


500x

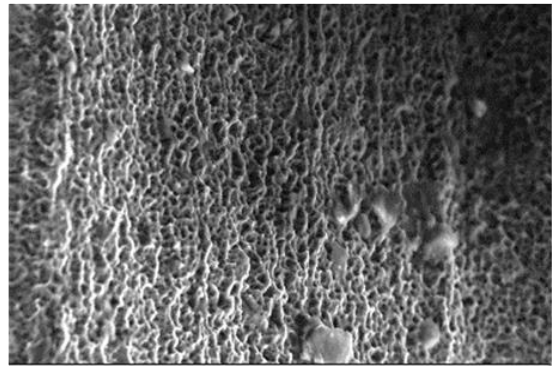
Grupo ALD



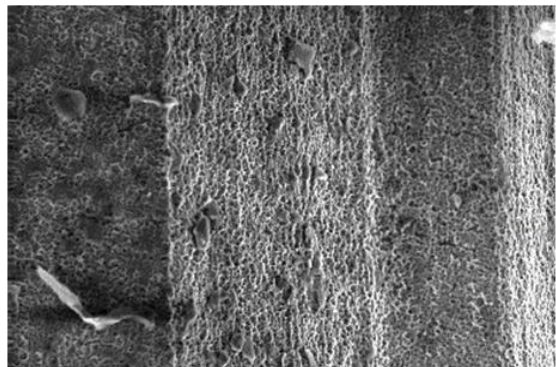
10.000x



5.000x



1.000x

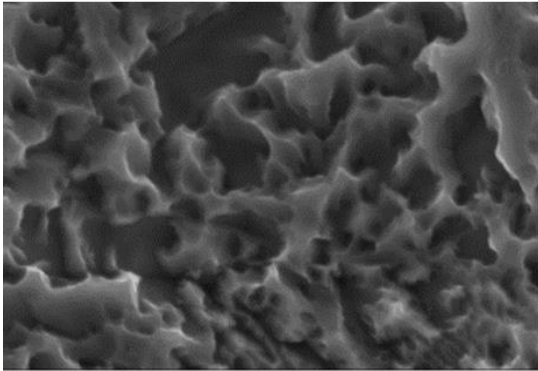


500x

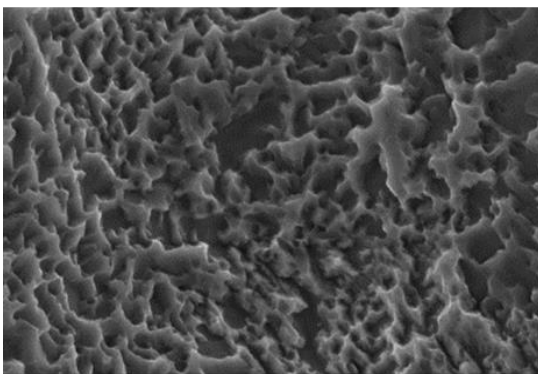
Figura 4 – Imagens representativas dos terços médios dos implantes submetidos aos tratamentos nas magnificações de 500, 1000, 5000 e 10000x em MEV.

Implantes – Terço Apical

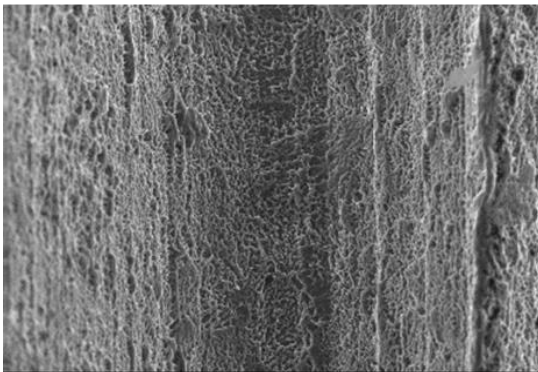
Grupo CTL



10.000x



5.000x

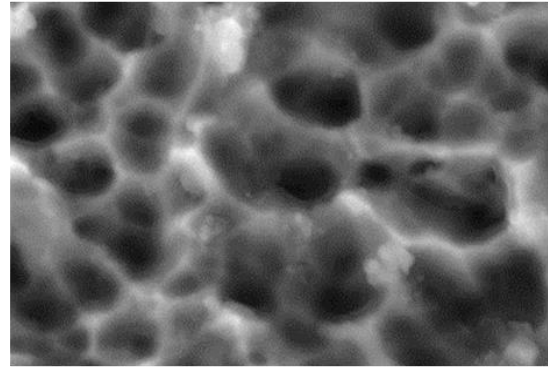


1.000x

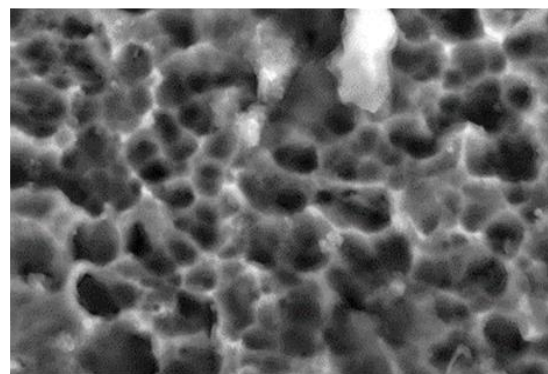


500x

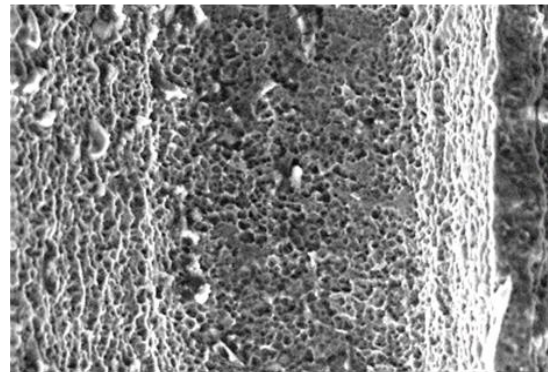
Grupo ALD



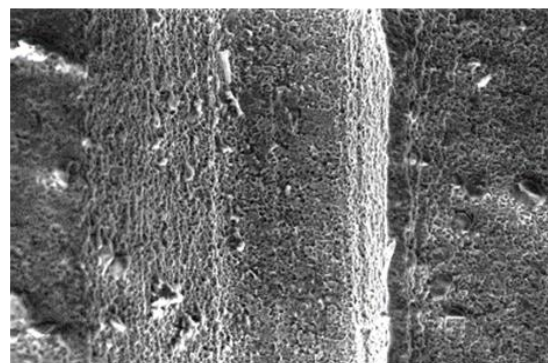
10.000x



5.000x



1.000x



500x

Figura 5 – Imagens representativas dos terços apicais dos implantes submetidos aos tratamentos nas magnificações de 500, 1000, 5000 e 10000x em MEV.

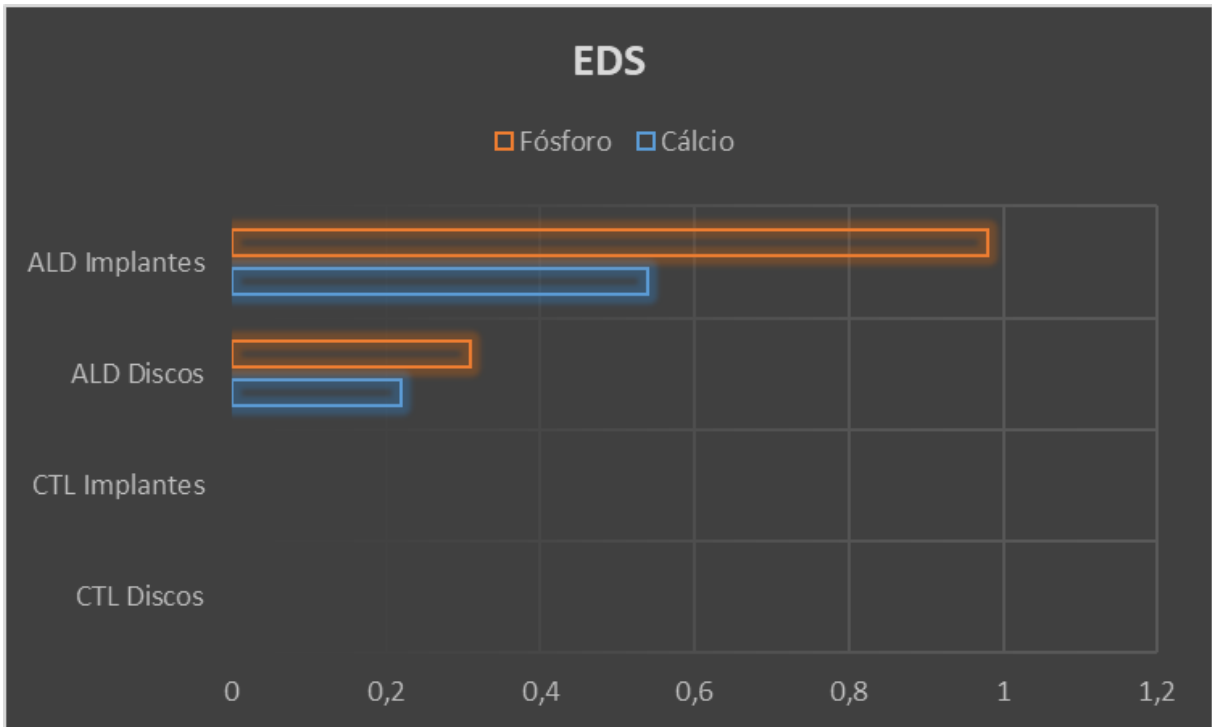


Figura 6 – Representação gráfica dos dados obtidos frente ao percentual de peso cálcio e fósforo presentes na superfície das amostras selecionadas dentre os grupos CTL e ALD.

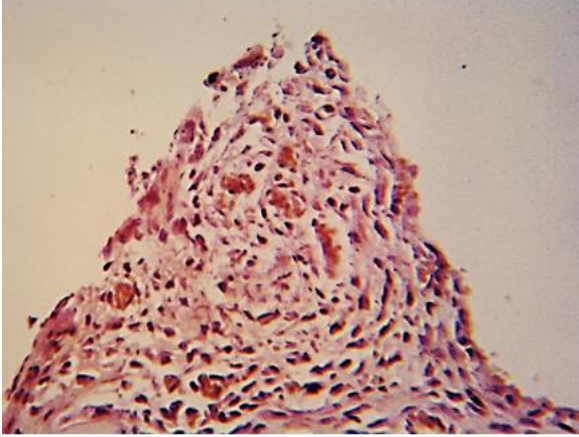
OSTEOCALCINA

CTL

ALD

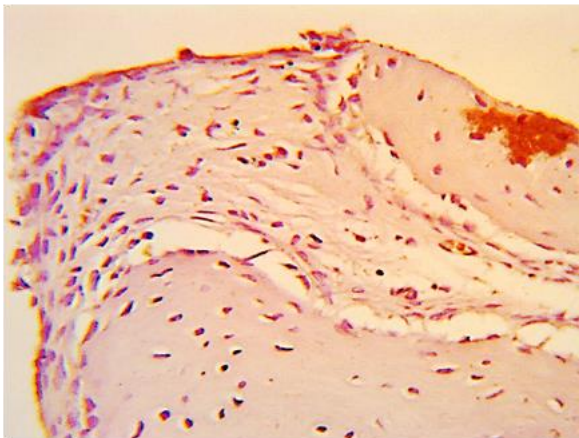
7 DIAS

7 DIAS

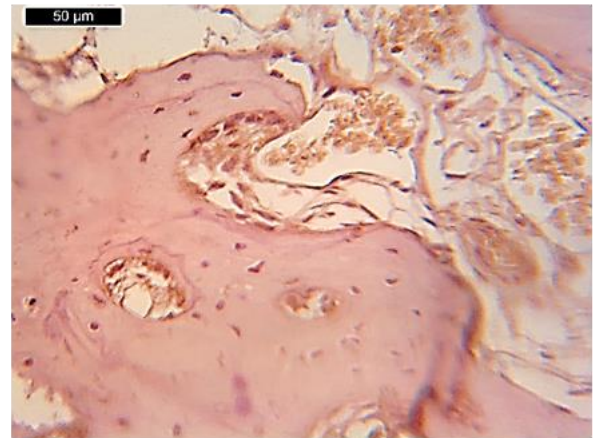


40 DIAS

40 DIAS



40X



40X

Figura 7 – Fotomicrografias da análise imunoistoquímica para osteocalcina com 7 e 40 dias.

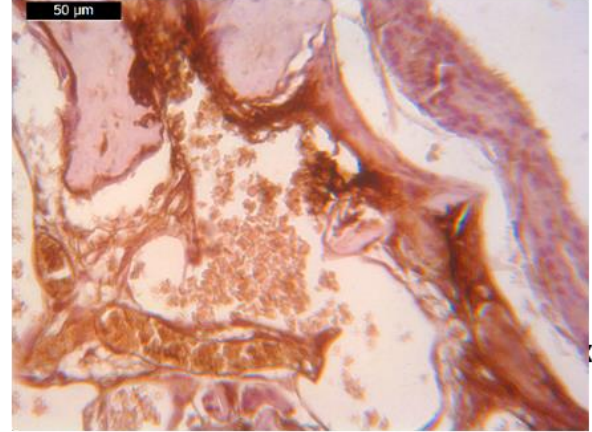
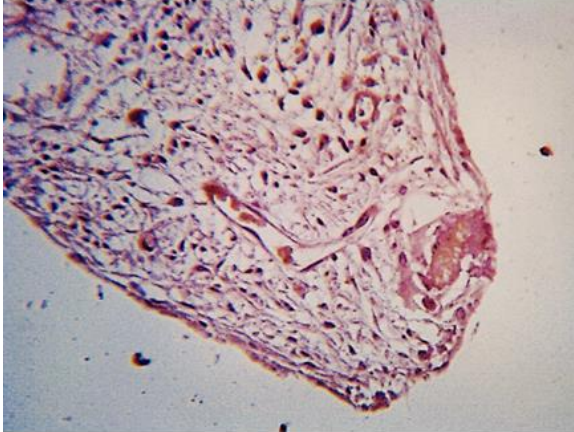
TRAP

CTL

ALD

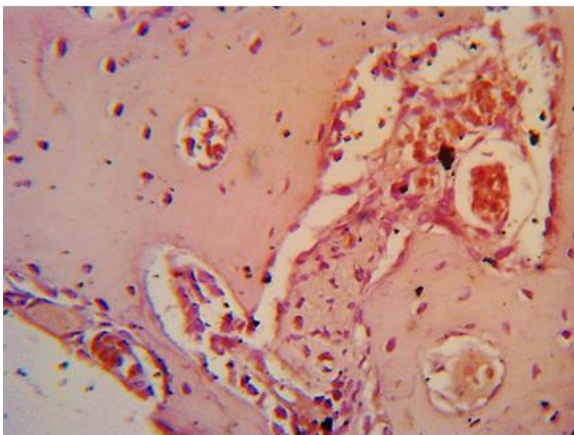
7 DIAS

7 DIAS



40 DIAS

40 DIAS



40X

40X

Figura 8 – Fotomicrografias da análise imunohistoquímica para TRAP com 7 e 40 dias.

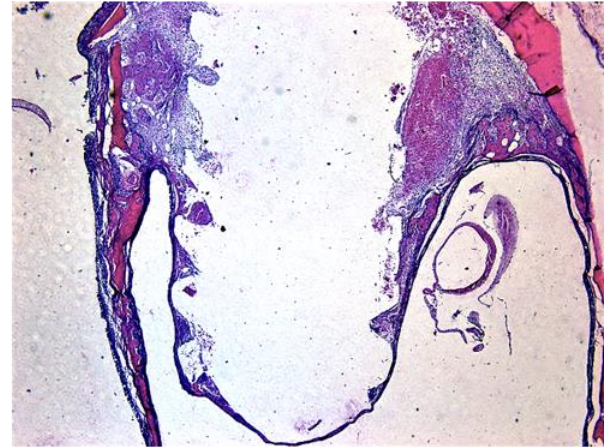
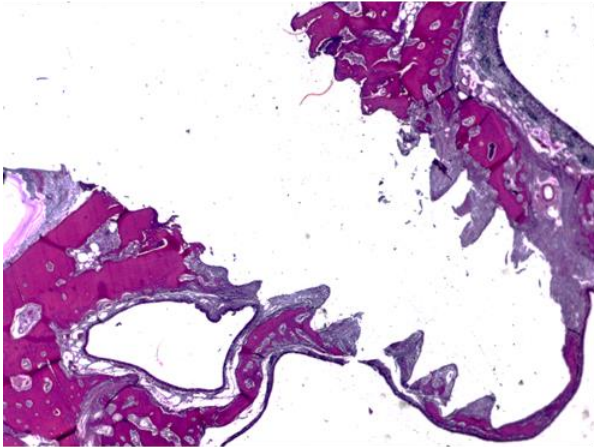
ELCOI

CTL

ALD

7 DIAS

7 DIAS



40 DIAS

40 DIAS

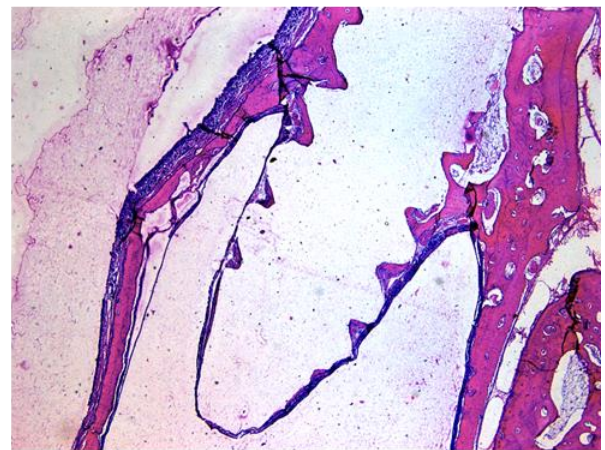
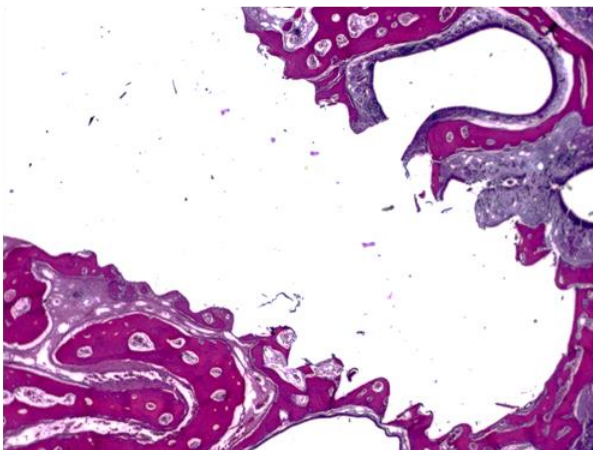


Figura 9 – Fotomicrografias da análise histológica para ELCOI entre os grupos CTL e ALD para 7 e 40 dias.

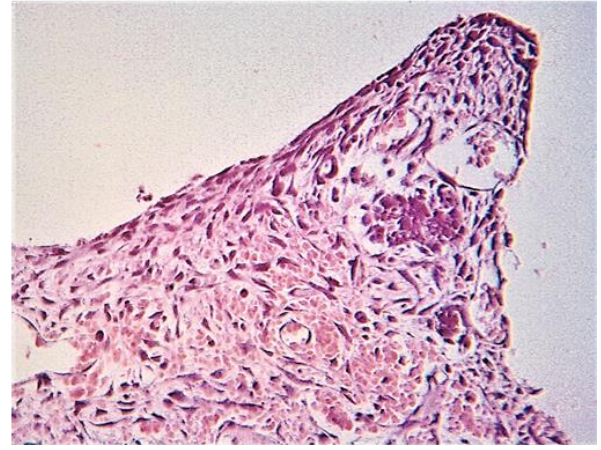
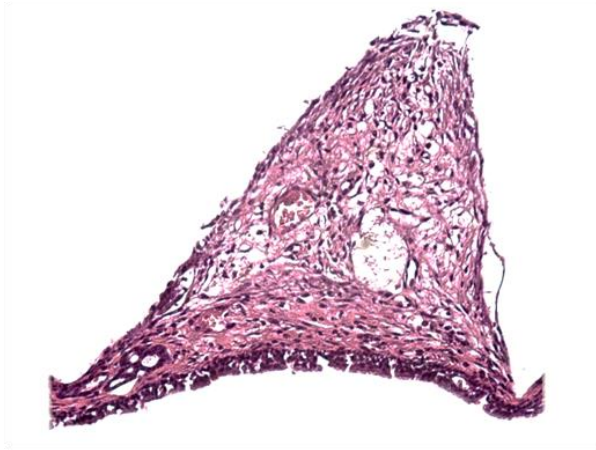
AON

CTL

ALD

7 DIAS

7 DIAS



40 DIAS

40 DIAS

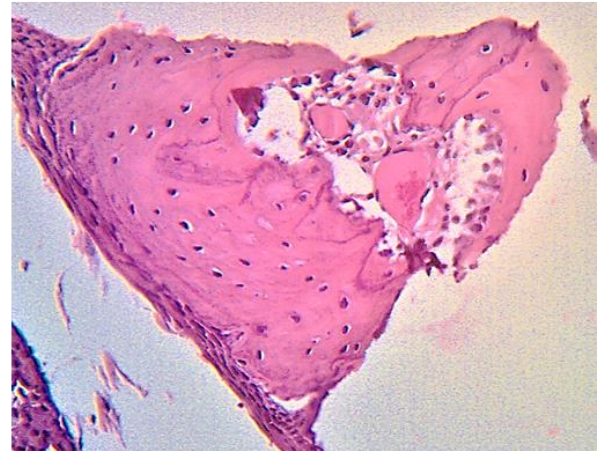
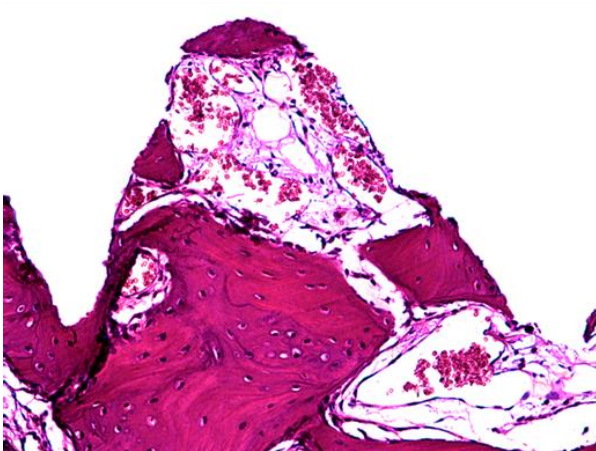


Figura 10 – Fotomicrografias da análise histológica para AON entre os grupos CTL e ALD para 7 e 40 dias.

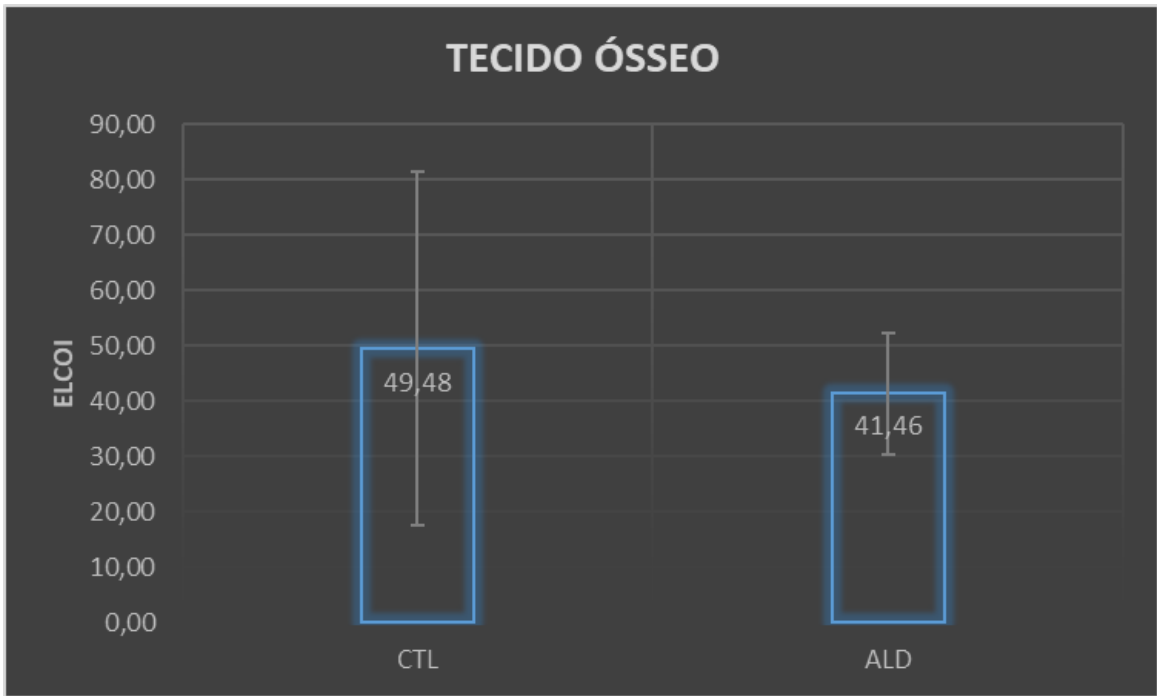


Figura 11 – Gráfico da ELCOI comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em mm das amostras aos 7 dias ($p = 0,757$).

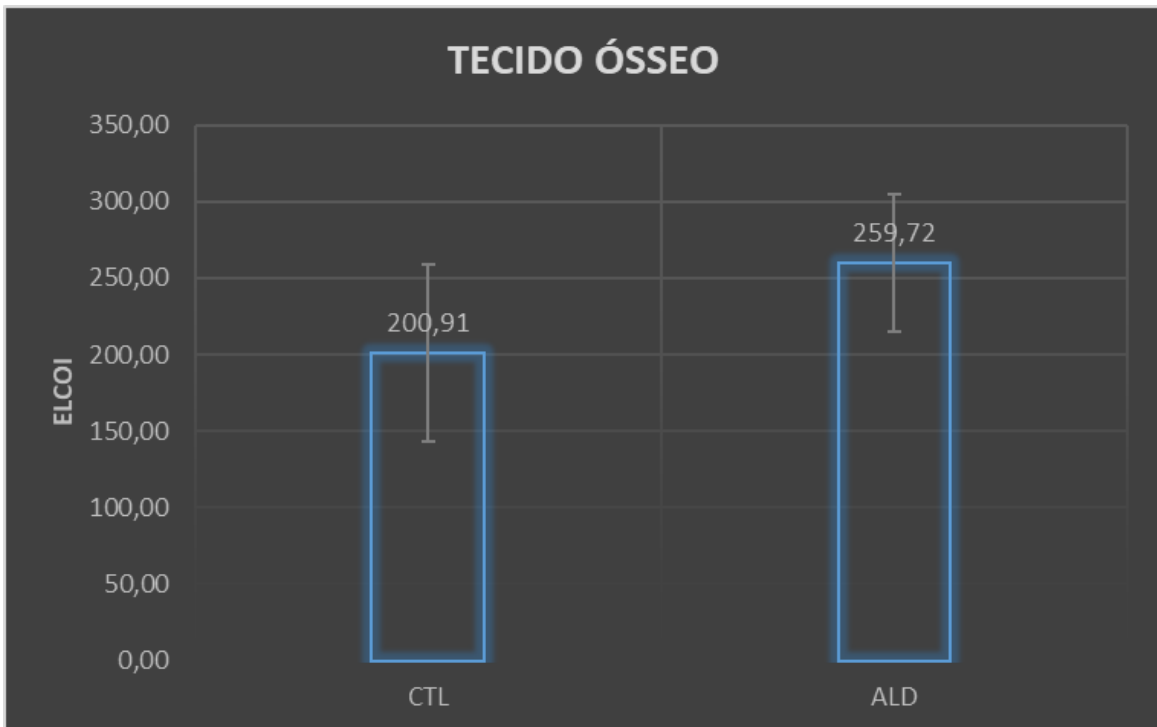


Figura 12 – Gráfico da ELCOI comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em mm das amostras aos 40 dias ($p = 0,035$).



Figura 13 – Gráfico da AON comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em mm² das amostras aos 7 dias ($p = 0,019$).

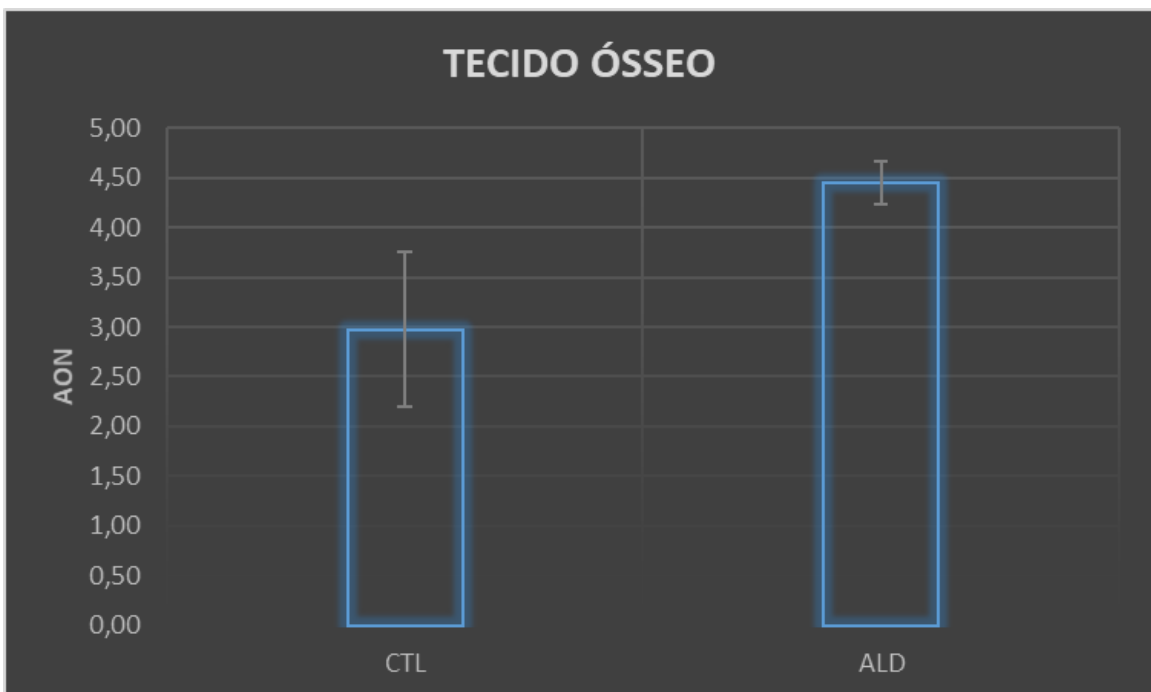


Figura 14 – Gráfico da AON comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em mm² das amostras aos 40 dias ($p < 0,001$).

TABELAS

Discos

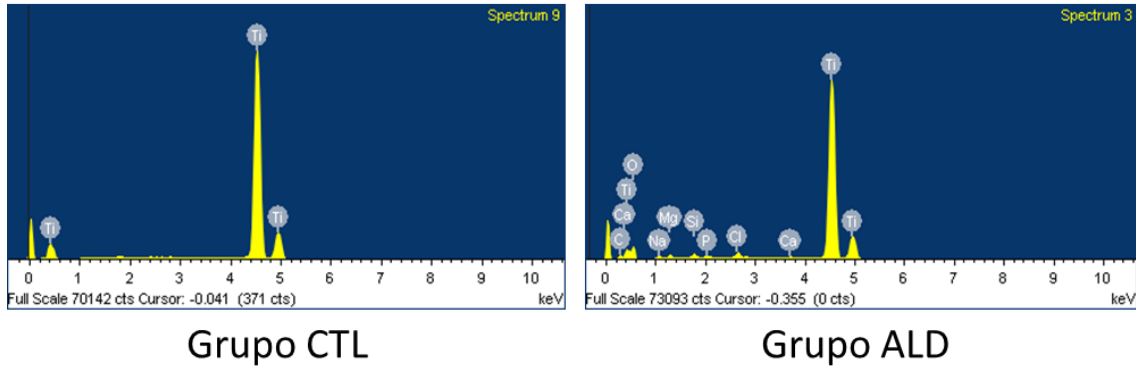


Tabela 1 – Tabela referente aos picos dos elementos cálcio, fósforo e titânio presentes na superfície dos discos selecionados dentre os grupos CTL e ALD.

Implantes

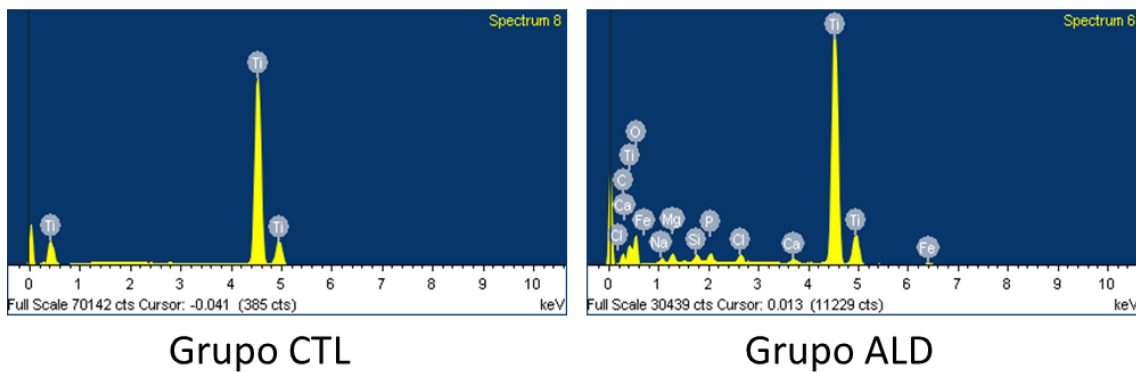


Tabela 2 – Tabela referente aos picos dos elementos cálcio, fósforo e titânio presentes na superfície dos implantes selecionados dentre os grupos CTL e ALD.

Grupos	Água (°)	Diiodo- metano (°)	Etieno Glicol (°)	γ_s (mN/m)	γ_s^{LW} (mN/m)	γ_s^{AB} (mN/m)	γ_{s+} (mN/m)	γ_{s-} (mN/m)	H-H (mN/m)
CTL	100.4	79.0	87.7	16.4	18,0	-1.6	0.1	5.5	18,0
ALD	<u>81.4</u>	71.7	74.9	<u>17.6</u>	21.9	-4.3	0.2	<u>19.7</u>	21.9

Tabela 3 – Tabela obtida por análise em goniômetro mostrando dados referentes a maior hidrofília, sublinhados e em negrito, diferenciando os grupos CTL e ALD.



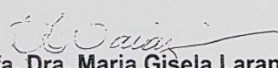
	GRUPO CTL				GRUPO ALD			
	ELCOI (mm)		AON (mm ²)		ELCOI (mm)		AON (mm ²)	
	T.Ósseo	T.Mole	T.Ósseo	T.Mole	T.Ósseo	T.Mole	T.Ósseo	T.Mole
7 dias	49,482	262,419	1,076	3,074	41,459	281,656	0,154	4,190
40 dias	200,913	90,755	2,9746	2,0634	259,716	70,957	4,448	1,051

Tabela 4 – Tabela demonstrativa relacionando as médias obtidas nas mensurações de ELCOI e AON.

ANEXOS

Anexo 1

Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"	
	CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA	
	CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals	
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Implantes de titânio com superfície tratada a base de alendronato em levantamento da membrana sinusal. Estudo experimental de superfície, análise biomecânica, histométrica e imunohistoquímica em coelhos", Processo FOA nº 2014-00891, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Setembro de 2014.</p>		
VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 20 de Junho de 2016.		
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 20 de Julho de 2016.		
CERTIFICATE		
<p>We certify that the study entitled "Titanium implants with treated surface by alendronate in maxillary sinus augmentation. Experimental study of surface, biomechanical, histometric and immunohistochemistry analysis in rabbits", Protocol FOA nº 2014-00891, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 24, 2014.</p>		
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 20, 2016.		
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 20, 2016.		
 Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira Coordenadora da CEUA CEUA Coordinator		
<hr/> <small>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</small>		

Anexo 2

Normas IJOMS

International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery



ISSN: 0901-5027

Impact Factor: 1.918

Guide for authors:

<https://www.elsevier.com/journals/international-journal-of-oral-and-maxillofacial-surgery/0901-5027/guide-for-authors>