

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CÂMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA

KAREN LUMI NAKASATO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, IMUNOISTOQUÍMICA E
BIOMECÂNICA DO OSSO AO REDOR DE IMPLANTES COM
TEXTURIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE PRODUZIDA POR
OXIDAÇÃO ELETROLÍTICA POR PLASMA E
INCORPORADA COM CA E P EM RATAS
OSTEOPORÓTICAS**

ARAÇATUBA

- 2017 -

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CÂMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA

Karen Lumi Nakasato

Avaliação histológica, imunoistoquímica e biomecânica do osso ao redor de implantes com texturização de superfície produzida por Oxidação Eletrolítica por Plasma e incorporada com Ca e P em ratas osteoporóticas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani

Coorientadora: Prof.^a Dra. Roberta Okamoto

ARAÇATUBA

- 2017 -

Dedicatória

Dedico este trabalho

Primeiramente aos meus pais Takanori Nakasato e Elena Hissae Takahashi Nakasato por toda a dedicação, compreensão e apoio incondicional por iluminarem o meu caminho e tornarem possível este sonho. Mesmo diante das dificuldades, vocês acreditaram em mim. Cada vez mais, torno-me uma pessoa de valores graças a vocês!

Aos meus avós, Takashi Nakasato, Kioko Nakasato, Cirozi Takahashi (*in memoriam*) e Massako Takahashi, pelo incentivo e por sempre me receberem de braços abertos com um sorriso estampado. À eles, expressarei minha eterna gratidão.

Ao Vitor Lui Nakamura Kumazawa pelo amor, compreensão e companheirismo. Estando ao seu lado, sinto-me amada e os obstáculos são menos desafiadores e mais possíveis. Muito obrigada por estar tão presente no meu dia-a-dia!

Aos meus queridos professores, pela amizade, experiência e aprendizado que vivenciei e adquiri nestes cinco últimos anos, mas que levarei por toda a minha vida com muito carinho!

Aos meus amigos pela amizade, conhecimento e várias risadas compartilhadas. Vocês estavam presentes nos momentos mais difíceis e estavam de prontidão para me escutar e ajudar!

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – FOA/UNESP e principalmente ao Departamento de Ciências Básicas e o Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada pela oportunidade de aprendizado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani, sou grata pela amizade e pela convivência desde o meu primeiro ano de faculdade, do qual tive o privilégio de adquirir conhecimento na área clínica e científica em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia. Sempre fui muito bem acolhida por você e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas com muita humildade e generosidade. Fico extremamente feliz que toda a sua determinação e foco estão sendo recompensados. Guardarei com muito carinho o seu modo gentil de recepcionar todos em sua sala. Sou extremamente agradecida pela sua compreensão nestes cinco anos.

À minha querida coorientadora, Prof.^a Dra. Roberta Okamoto, sou grata principalmente pela amizade e carinho. Além de ter me acolhido calorosamente em minha primeira iniciação científica, considero-a uma amiga muito especial e referência de valores como pessoa. Muito obrigada pela oportunidade de convivência, pelos risos e pelo aprendizado. Tenho um enorme carinho pela senhora e com certeza isto perdurará.

Ao Prof. Dr. José Américo de Oliveira, por ser o primeiro professor na graduação que tive maior contato. Sou grata pelas oportunidades de aprendizado e por sempre me incentivar e acreditar em minha capacidade.

À Prof.^a Dra. Mariza Akemi Matsumoto, sou grata pela amizade, incentivo e risadas compartilhadas. Guardarei seu sorriso e todas as lembranças que tivemos. Juntamente com a Prof.^a Roberta, vocês são as melhores professoras que tive.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas, Prof.^a Alaíde Gonçalves, Prof. Paulo Roberto Botacin, Prof. Edson Ervolino, Prof. Roelf Justino

Cruz Rizzolo e Prof. Cláudio Aparecido Casatti, sou grata pela boa convivência, aprendizado e risadas.

Aos professores do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Prof.^a Ana Paula Farnezi Bassi, Prof.^a Daniela Ponzoni, agradeço pela prontidão, conselhos e orientação na clínica de Cirurgia e Implantodontia.

Aos amigos de projeto da pós-graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, Gustavo Momesso, Tárík Ocon Braga Polo, William Phillip Pereira da Silva e Valthierre Nunes de Lima, pela amizade, companheirismo e orientação clínica e científica. Sou muito grata pelos ensinamentos passados e adquiridos. Todos os estudos que fizemos juntos, com certeza foi graças à união que tivemos. Desejo a cada um de vocês um caminho próspero, repleto de sucesso e de muito rock.

Aos amigos e colegas de Iniciação Científica, Ana Cláudia, Danila, Elisa, Fernanda Yogui, Fernanda Furuse, Jaqueline Hassumi, Letícia Pitol, Luan, Luy, Maria Isabela, Naara, e Paula, pela amizade, aventuras e experiências. Sem a ajuda de cada um de vocês, minha iniciação científica não teria sido a mesma.

Aos colegas e amigos da pós-graduação de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia, Cristian Statkievicz, Gabriel Mulinari, Igor de Oliveira Puttini, Maria Del Pilar Rodriguez Sanchez, Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira, Rafael Santiago de Almeida. Apesar da distância, o carinho e a amizade que tenho por cada um de vocês é muito grande.

Aos funcionários técnico-administrativos da Biblioteca e do Departamento de Ciências Básicas e de Cirurgia e Clínica Integrada, sou grata pela prontidão e receptividade sempre que precisei.

Aos meus queridos amigos da Turma 59, principalmente Erika, Lara, Laís, Letícia Brasil e Pedro Chaves, pela amizade verdadeira e sincera, pelas horas de estudos, pelas risadas e desabafos. Muito obrigada pela convivência e tenho muito orgulho de dizer que sou amiga de vocês. Com certeza serão profissionais competentes e de excelência.

À Emfils, pela doação dos implantes osseointegráveis utilizados neste estudo.

Ao Professor Valentim Adelino Ricardo Barão e o doutorando Jairo Cordeiro da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pelo auxílio essencial na condução deste trabalho, desde a idealização e execução das análises por PEO. Muito obrigado pela honrosa oportunidade de trabalhar junto com a sua equipe.

Ao Professor Nilson Cruz, professores e técnicos do Laboratório de Plasmas Tecnológicos da Faculdade de Engenharia de Sorocaba (UNESP) pela facilitação da técnica de texturização por plasma eletrolítico (PEO). Minha gratidão.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão da bolsa de estudos e auxílio a esta pesquisa.

Epígrafe

“Nunca se esqueça de quem você é, porque é certo que o mundo não se lembrará. Faça disso sua força. Assim, não poderá ser nunca a sua fraqueza. Arme-se com esta lembrança, e ela nunca poderá ser usada para magoá-lo”

George R. R. Martin

NAKASATO, K. L. **Avaliação histológica, imunoistoquímica e biomecânica do osso ao redor de implantes com texturização de superfície produzida por Oxidação Eletrolítica por Plasma e incorporada com Ca e P em ratas osteoporóticas.** 2017. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

A osteoporose é uma doença sistêmica que altera o metabolismo ósseo e diminui a quantidade e qualidade do tecido ósseo, resultando em uma densidade óssea menor e comprometendo a taxa de sucesso em instalações de implantes osseointegráveis. Assim, a tendência atual é de desenvolver e utilizar implantes constituídos de Titânio modificados microestruturalmente para melhores propriedades físico-químicas e biológicas para o osso periimplantar, possibilitando um adequado reparo ósseo em áreas críticas. O objetivo deste estudo foi avaliar uma nova técnica de texturização de implantes pela oxidação eletrolítica por plasma (PEO) com incorporação de Ca e P, em ratas com osteoporose induzida. 20 ratas Wistar, fêmeas, adultas, com peso de 250 a 300 gramas, foram divididas em dois grupos: PEO (implantes texturizados com PEO e incorporados com Ca e P) e AC (implantes texturizados com duplo ataque ácido). Inicialmente as ratas foram submetidas à ovariectomia e após 90 dias, foi instalado um implante em cada tibia, sendo um implante pertencente ao grupo PEO e o outro implante do grupo AC. Após 42 dias da instalação dos implantes, 10 animais foram submetidos à eutanásia e suas tíbias passaram pela descalcificação, para a análise histológica (coloração com hematoxilina e eosina) e imunoistoquímica, com anticorpos primários contra Osteoprotegerina (OPG), RANKL, Osteocalcina (OC) e TRAP. As demais ratas (n=10), após a eutanásia, tiveram os implantes submetidos ao torque reverso em torquímetro digital (N.cm). Todos os dados quantitativos foram submetidos a um teste de normalidade para adotar o melhor teste estatístico (paramétrico e não paramétrico), adotando o nível de significância $p < 0,05$. A análise histológica mostrou que houve maior neoformação óssea no grupo PEO quando comparado ao grupo AC. A avaliação imunoistoquímica demonstrou que o grupo AC obteve resultado inferior do ponto de vista metabolismo ósseo, devido à leve imunomarcagem da proteína OC. As demais proteínas OPG, RANKL e TRAP não tiveram resultados discrepantes entre os grupos. A análise biomecânica por torque-

reverso (N.cm) mostrou que os maiores valores pertenciam ao grupo PEO ($p < 0,05$). Portanto, estes resultados são encorajadores para a técnica de texturização por PEO e devem ser suplementados por análises estruturais e biológicas para futuras aplicações na clínica cirúrgica.

Palavras-Chaves: Oxidação. Osteoporose. Regeneração Óssea. Implantes Dentários.

NAKASATO, K. L. **Histological, immunohistochemical and biomechanical evaluation of bone around implants with surface texturing produced by Plasma Electrolytic Oxidation coating with Ca and P on osteoporotics rats.** 2017. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

Osteoporosis is a systemic disease that modifies the bone metabolism and reduces the quantity and quality of bone tissue, resulting in lower bone density and commits the installation success rate of osseointegrated implants. Thus, the currently trend is to develop and use microstructural modified Titanium implants for better physicochemical and biological properties to the peri-implant bone, allowing a suitable bone repair in critical areas. The objective of this study was to evaluate a new surface texturing technique using Plasma Electrolytic Oxidation (PEO) with Ca and P in rats with induced osteoporosis. 20 Wistar rats, female, adult, weighing 250 to 300 grams, were divided in two groups: PEO (textured implants by PEO with Ca and P incorporation) and AC (double etching-acid textured implants). Firstly, the rats were submitted to ovariectomy and after 90 days, implants were installed on each tibia, considering one implant belongs to PEO group and the other to the AC group. After 42 days of the implant installation, 10 animals were subjected to euthanasia and their tibias were decalcified for histological (hematoxylin and eosin staining) and immunohistochemical analysis, with primary antibodies against Osteoprotegerin (OPG), RANKL, Osteocalcin (OC) and TRAP. The other rats (n=10), after euthanasia, had their implants submitted to the reverse torque in digital torque wrench (N.cm). All the quantitative data were submitted to the normality test curve to establish the best statistical test (parametric or nonparametric), considering $P < 0.05$ significance level. . The histological analysis showed that there was more bone neoformation in the PEO group when compared to the AC group. The immunohistochemical evaluation showed that the AC group had inferior results from the point of view of bone metabolism due to the slight immunolabeling of the OC protein. The other OPG, RANKL and TRAP proteins did not present any discrepant results between groups. The biomechanical analysis by reverse torque (N.cm) showed that the highest values belonged to the PEO group ($p < 0,05$). Therefore,

these results are encouraging for the PEO texturing technique and should be supplemented by structural and biological analyzes for future applications in the surgical clinic.

Keys-words: Oxidation. Osteoporosis. Bone Regeneration. Dental Implants.

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

- Tabela 1:** Dados da Espectroscopia de Energia Dispersiva da superfície da liga Ti-6Al-4V texturizada por PEO.....9
- Tabela 2:** Representação dos escores atribuídos na análise imunoistoquímica para as proteínas OPG, RANKL, OC e TRAP para cada grupo experimental.....29
- Gráfico 1:** Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão de torque reverso (N.cm) para os grupos experimentais (OBD OVX e ODN SHAM, PEO e AC).....31

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------|--|
| PEO | Texturização por Oxidação Eletrolítica por Plasma |
| AC | Texturização por Duplo Ataque Ácido |
| OVX | Ratas ovariectomizadas |
| SHAM | Ratas submetidas à cirurgia ficcional não ovariectomizadas |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| OPG | Osteoprotegerina |
| OC | Osteocalcina |
| Ticp | Titânio Comercialmente Disponível |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) na magnitude de 300x da liga Ti-6Al-4V com texturização PEO | 8 |
| Figura 2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) na magnitude de 2000x da liga Ti-6Al-4V com texturização PEO | 9 |
| Figura 3 - Mapeamento dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com texturização PEO pela técnica de EDS..... | 10 |
| Figura 4 - Mapa de cores mostrando a distribuição dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com texturização Oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO) pela técnica de EDS..... | 10 |
| Figura 5 - Mapa de cores mostrando a distribuição dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com texturização Oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO) pela técnica de EDS..... | 11 |
| Figura 6 - Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal | 12 |
| Figura 7 - Etapas cirúrgicas do procedimento de ovariectomia | 14 |
| Figura 8 - Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes | 16 |
| Figura 9 - Fotomicrografias dos grupos experimentais em função dos métodos de texturização dos implantes em HE, nos aumentos originais 6,3x, 12x, 25x e 40x | 20 |
| Figura 10 - Fotomicrografias em maior detalhe dos grupos experimentais em função dos métodos de texturização dos implantes em HE, no aumento original 40x | 21 |
| Figura 11 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) com imunomarcação positiva para proteína OPG..... | 22 |

| | |
|--|----|
| Figura 12 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) com imunomarcação positiva para proteína RANKL..... | 23 |
| Figura 13 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) com imunomarcação positiva para proteína OC..... | 24 |
| Figura 14 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) com imunomarcação positiva para proteína TRAP..... | 25 |
| Figura 15 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) com imunomarcação positiva para proteína OPG..... | 26 |
| Figura 16 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) com imunomarcação positiva para proteína RANKL..... | 27 |
| Figura 17 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) com imunomarcação positiva para proteína OC..... | 28 |
| Figura 18 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) com imunomarcação positiva para proteína TRAP..... | 29 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVO | 6 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 7 |
| 3.1 – Caracterização estrutural | 7 |
| 3.2 – Estudo da caracterização da superfície | 7 |
| 3.3 – Indução da osteoporose | 12 |
| 3.4 – Instalação de implantes | 15 |
| 3.5 – Análises do reparo ósseo periimplantar..... | 17 |
| 3.6 – Forma de análises dos resultados | 18 |
| 4. RESULTADOS | 20 |
| 4.1 – Análise histológica | 20 |
| 4.2 – Análise imunoistoquímica | 21 |
| 4.3 – Análise biomecânica (contra-torque) | 30 |
| 5. DISCUSSÃO | 32 |
| 6. CONCLUSÃO | 34 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 35 |

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, os implantes médico-dentários constituídos de Titânio (Ti) são amplamente estudados e investigados pela literatura científica. O Ti é empregado na confecção de implantes osseointegráveis e apresenta na forma pura (98% de Ti) sendo a denominação para o titânio comercialmente disponível (Ticp) (1). Quando há a presença de impurezas resultantes do processo de fundição, forjamento ou laminação, como a Sílica e o Ferro, a resistência mecânica do material é aumentada. No mercado da Implantodontia, o Ti grau IV (ASTM F67) é o mais utilizado na confecção dos implantes dentários (2).

Durante os 50 anos dos princípios da osseointegração, a indústria biomédica desenvolveu várias modificações visando à melhoria das propriedades estruturais e biológicas dos implantes (3, 4). Assim, os processos de texturização de superfície de implantes dentários objetivam uma maior superfície de contato entre o implante e o tecido ósseo, permitindo o aumento da resistência mecânica, à corrosão e ainda o favorecimento das respostas biológicas da osseointegração, atraindo de forma mais eficaz as células da linhagem osteoblástica, principalmente em regiões de menor densidade do tecido ósseo (5).

Assim, dentre as modificações topográficas e físico-químicas na superfície dos implantes dentários (6, 7) (8-10), destacam-se as técnicas de adição que promovem uma superfície com saliências (recobertas por plasma spray de titânio - TPS e de hidroxiapatita - HA, recobrimentos com HA e outros fosfatos de cálcio e deposição de íons) (11, 12), e técnicas de subtração por meio de criação de poros e pits na superfície implantar (eletropolimento, polimento mecânico, tratamentos com ácidos, associados ou não ao jateamento com óxido de titânio – TiO₂ ou óxido de alumínio – Al₂O₃, oxidação e irradiação com laser (11, 13-15).

Estudos comparando implantes dentários de superfícies usinadas com superfície rugosa demonstraram superioridade de resultados em reparo ósseo nos implantes com superfície rugosa (16, 17). Uma maior retenção do coágulo sanguíneo, aumento da migração, proliferação celular e aumento da área de

superfície de contato do implante promovem resultados melhores através de uma melhor e mais rápida osteogênese na superfície periimplantar (10, 15, 18).

Alterações de superfície realizadas no Ti demonstram uma superfície biologicamente mais ativa que o Ti puro, os microporos são menores e mais arredondados quando realizado a incorporação de Na_2HPO_4 , melhorando as propriedades mecânicas (19).

Diante de diversas opções de texturizações de superfícies, há a preocupação de reunir características adequadas nos aspectos microestruturais e biológicos reparacionais (20-23). Apesar de a literatura mostrar que alguns métodos podem alterar a resistência mecânica, o comportamento eletroquímico e as respostas reparacionais do material, ainda existem ligas de Ti e texturizações que são comercializados no mercado médico-odontológico sem apresentar estudos *in vitro* ou *in vivo* prévios (7, 24-29).

Elementos incorporados precipitados na matriz do tecido ósseo, como o cálcio, fósforo e hidroxiapatita, resultam numa técnica interessante de texturização por adição através da demonstração de maior afinidade com as células fundamentais na formação óssea (15, 18, 30). Entre as principais técnicas de incorporação destes elementos precipitados na superfície dos implantes de TI são a anodização e o tratamento biomimético (31, 32). Atualmente, foi desenvolvido outro novo método de texturização superficial dos implantes, denominado de oxidação por plasma eletrolítico (PEO) ou também como deposição por faísca anódica, ainda na fase de análise *in vitro* (33, 34). Esta técnica consiste na oxidação acompanhada por microdescargas na superfície do Ti ou em suas ligas imersas em um eletrólito (34-36). A oxidação eletrolítica também apresenta passos simples com métodos químicos bem controlados para a produção de microporos bioativos na superfície dos implantes, dando uma melhor propriedade mecânica, térmica, corrosiva e tribocorrosiva (37-39).

O processo de texturização ainda cria um revestimento como alta força adesiva aos substratos, sendo um fator crucial para a osseointegração (40, 41). A incorporação de partículas possibilita o aumento dessa resistência a corrosão dos

substratos, possibilita o controle da degradação, a melhor manutenção mecânica e a osseointegração (42).

A adição de partículas de Mg, Al, Ti, C e P, apresenta melhoria na proteção quanto à corrosão e ao desgaste proporcionadas pelo PEO, sendo que a resposta celular inicial é maior com o C e P, em relação aos demais, devido uma maior efetividade para a biocompatibilidade e bioatividade (43). Segundo Zaporozhets (2017) a incorporação desses elementos possui uma capacidade de controlar melhor a resposta inflamatória local pela modificação do processo de ativação leucocitária do sangue, mais evidente nos neutrófilos em contato com a superfície da liga de Ti (44).

Estudo comparativo entre grupos com a incorporação de C e grupos com incorporação de Na, nos mostra a melhor formação de volume ósseo, com maior número de osteoblastos na superfície neoformada dos grupos C, não obtendo diferenças na nanotopografia, rugosidade superficial e superfície cristalina dos dois grupos (45).

Marques et al. (2015) publicaram dois estudos em que foram avaliadas a PEO para a confecção de texturização superficial do Ticp com incorporação de cálcio, fósforo, prata e sílica, contendo diferentes concentrações destes elementos para verificar quais as melhores propriedades estruturais e de biocompatibilidade. Superfícies que continham maiores concentrações de Ca e P tiveram uma formação de estrutura cristalina mais homogênea e com poros largos (aparência semelhante a vulcão, comprovado pela Microscopia de Força Atômica). Ainda sobre a PEO com incorporação de Ca e P, obteve propriedades antibacterianas nos testes microbiológicos e melhor proliferação de células mesenquimais no teste de cultura de células. Devido aos bons resultados, os autores encorajam novos estudos para avaliar o processo de texturização para que haja sua utilização no mercado de implantes dentários (34).

A qualidade do tecido ósseo é essencial para que haja o fenômeno da osseointegração. O complexo implante/tecido ósseo periimplantar não é um processo estático, pois é submetido a constantes oscilações térmicas, químicas e mecânicas, induzindo a um processo de remodelação constante e levando a uma

homeostasia mineral e função de suporte ao tecido ósseo (46, 47). Essa dinâmica óssea envolve reabsorção, formação e mineralização de forma coordenada. Na presença de algum fator que altere o balanceamento entre catabolismo e anabolismo, a qualidade do tecido ósseo é comprometida, resultando no desenvolvimento de uma condição patológica (48).

Alterações no metabolismo ósseo, como a osteoporose, podem levar ao comprometimento da taxa de sucesso em implantes osseointegráveis (49, 50). Esta condição sistêmica leva a uma diminuição expressiva da densidade óssea, através de formações de trabéculas ósseas mais finas e com menor atividade angiogênica. Apesar de a literatura não a posicionar como contraindicação para a reabilitação implantossuportada, a osteoporose comprovadamente reduz a taxa de sobrevivência dos implantes (49-52).

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica com perda óssea generalizada progressiva, ocasionada pelo desequilíbrio e/ou desacoplamento da atividade de remodelação óssea. A doença leva a uma degeneração da microarquitetura óssea, facilitando a ocorrência de fraturas ósseas, como o fêmur, rádio e coluna lombar, sendo até associadas ao aumento da morbidade e mortalidade (53, 54). Esta condição sistêmica acomete geralmente mulheres, devido à depleção no fornecimento de estrógeno na fase pós-menopausa (55-57).

Atualmente, com o aumento da expectativa de vida da população mundial e a maior procura de tratamento reabilitador com o uso de implantes dentários, além da possibilidade dos indivíduos desenvolverem alterações sistêmicas desfavoráveis ao tecido ósseo (58-63), tornou-se necessário a realização de diversos estudos buscando um melhor desenvolvimento no processo de reparo ósseo envolvendo implantes osseointegráveis (64).

Na literatura o modelo experimental de instalação de implantes em tíbias de ratos é bem empregado, devido à facilidade de técnica e à presença de dimensões adequadas quando comparado à maxila. Assim, em grande parte da literatura é utilizada a instalação de implantes na metáfise tibial (65-69). No estudo de revisão de (Glozel, Kuchler et al. 2010) (70) para a instalação dos implantes em ratos, foram eleitos os sítios maxila, fêmur e também a tíbia.

O modelo da osteoporose experimental, caracterizando os ossos de menor densidade, é interessante para analisar o comportamento biológico da osseointegração e também a influência dos métodos de texturização de superfície dos implantes (71-76). Diante das condições sistêmicas, este projeto, além das variáveis, também verificará o desenvolvimento da osteopenia simulando situações de mulheres com hipogonadismo ou que se submeteram ao procedimento de histerectomia na fase adulto jovem (25 – 30 anos de idade), o qual serão utilizadas ratas jovens (6 meses de idade) (77, 78), submetidas à ovariectomia bilateral.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar um novo método de texturização por PEO com incorporação de Ca e P na superfície de implantes de liga Ti-6Al-4V em ossos de baixa densidade, quantificando e qualificando os parâmetros reparacionais e imunoistoquímicos *in vivo* por meio da análise imunoistoquímica, histológica e biomecânica (torque-reverso).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização estrutural

Texturização de superfície através da oxidação por plasma eletrolítico

Os implantes de Ticp fornecidos pela empresa Emfils, com as dimensões de 2 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento (48), com superfície usinada foram tratados em um reator, acionado por um sistema elétrico composto pelos seguintes componentes: fonte de alimentação alternada com tensão de saída variável, um transformador, um circuito de retificação, um disjuntor, um amperímetro e um voltímetro. Um osciloscópio foi utilizado para verificar a forma da onda após a retificação. O sistema de processamento é composto pelo porta-eletrodos e a cuba eletrolítica.

Através do sistema elétrico, os eletrodos foram alimentados com tensão DC de até 1000 V e corrente máxima de 1,5 A. Um variador de tensão AC, acoplado na fonte permite o ajuste no valor desejado de tensão. No decorrer do tratamento, a temperatura da solução eletrolítica foi medida com um termômetro portátil. Os parâmetros de oxidação são a densidade de corrente de 50 mA/cm² e tensão 250-400 V. O tempo de oxidação foi de 5 minutos e a temperatura durante a oxidação mantida a 15 +/- 2 °C (48).

A solução eletrolítica foi preparada dissolvendo Ca(NO₃)₂.4H₂O, NH₄H₂PO₄ (3,6 x 10⁴ M) em 1L de água destilada, com relação molar sendo 1.67, a fim de promover a incorporação de diferentes íons na superfície especificada, com deposição de cálcio e fósforo durante 10 minutos (38, 39).

3.2. Estudo da Caracterização da Superfície

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Plasma Tecnológico da Faculdade de Engenharia da UNESP de Sorocaba e analisou a caracterização da superfície dos implantes de Ti-6Al-4V com superfície texturizada por PEO (grupo teste). A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi empregada para avaliar a composição química dos tratamentos de superfície. Análises químicas elementares em volumes pequenos (ordem de $1 \mu\text{m}^3$) foram realizadas por meio da técnica de EDS utilizando um espectrômetro. A observação do espectro inteiro de raios X de modo simultâneo permitiu a análise qualitativa rápida (mapeamento) dos principais elementos constituintes das superfícies dos implantes, possibilitando comparação da composição química das diferentes superfícies analisadas. O software Image J (National Institute of Health, EUA) foi usado para determinar o diâmetro médio dos poros e/ou compostos depositados para cada tipo de tratamento (79).

Independente da magnitude do aumento avaliado na MEV (300 ou 2000x), a representação das fotomicrografias mostrou a obtenção de superfície porosa, como poros visualmente homogêneos, com a geometria semelhante a "vulcão".

Figura 1 – Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV) na magnitude de 300x da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO.

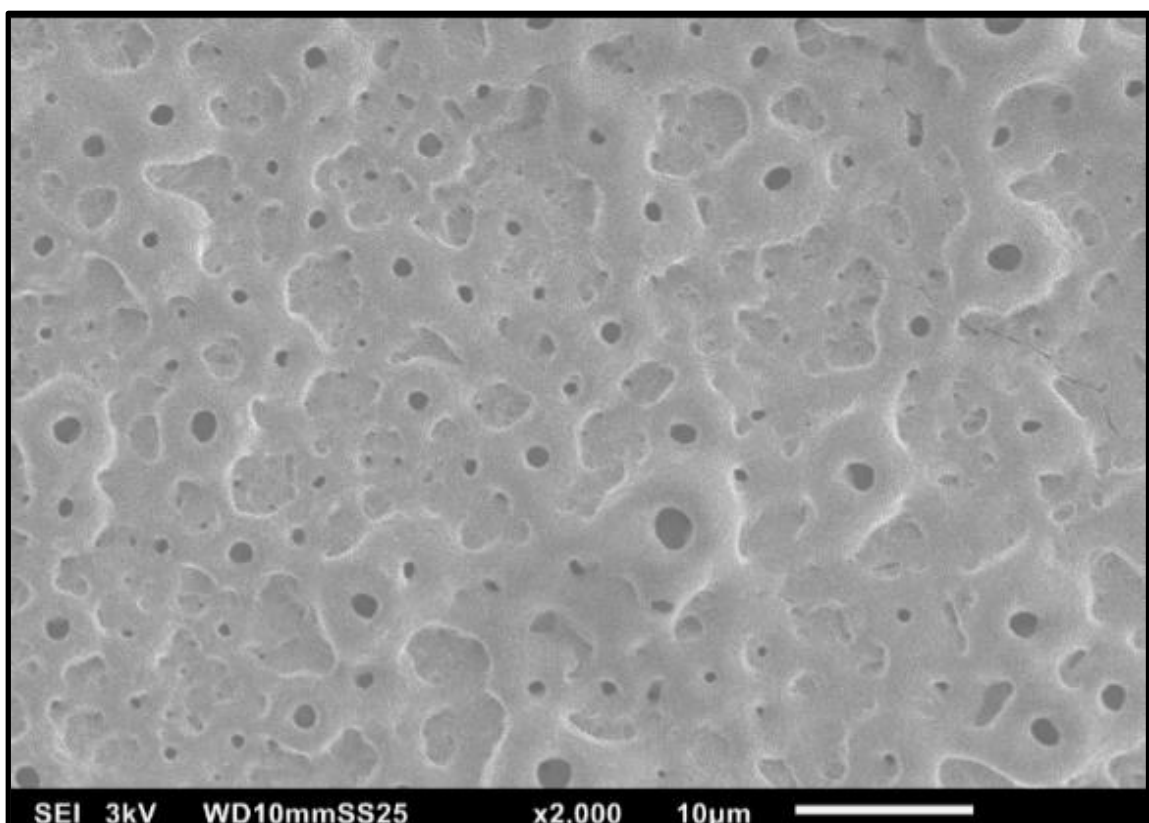
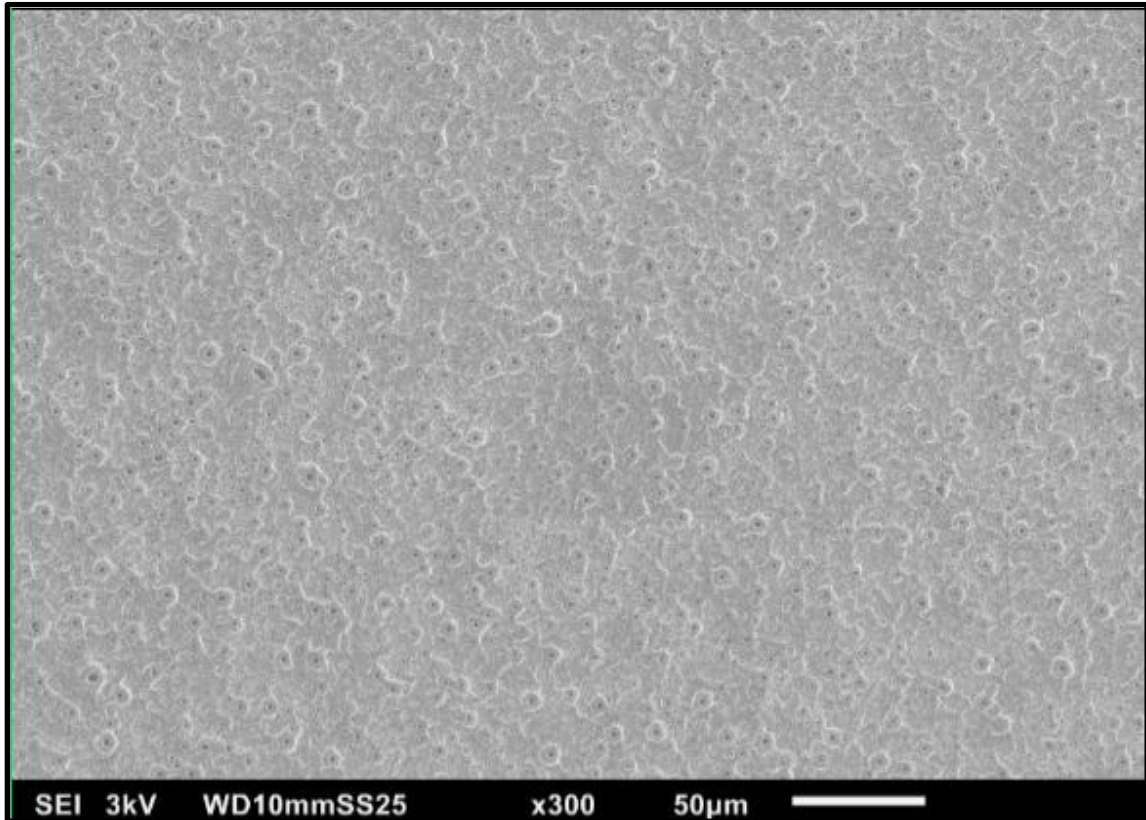


Figura 2 – Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV) na magnitude de 2.000x da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO.

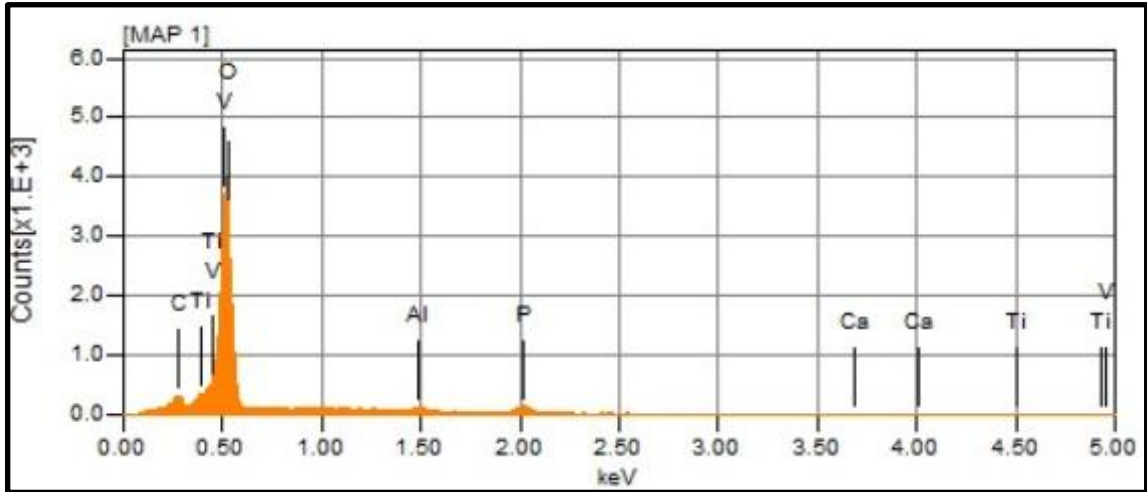


O mapeamento da composição química elementar da superfície da liga Ti-6Al-4V pela técnica de EDS confirmou as proporções de Ti, Al e V na composição dos espécimes, inclusive com a incorporação de Ca e P, como ilustrado na tabela 1 e figura 3, por meio das porcentagens de massas dos constituintes da liga.

Tabela 1 - Dados da Espectroscopia de Energia Dispersiva da superfície da liga Ti-6Al-4V texturizada por PEO.

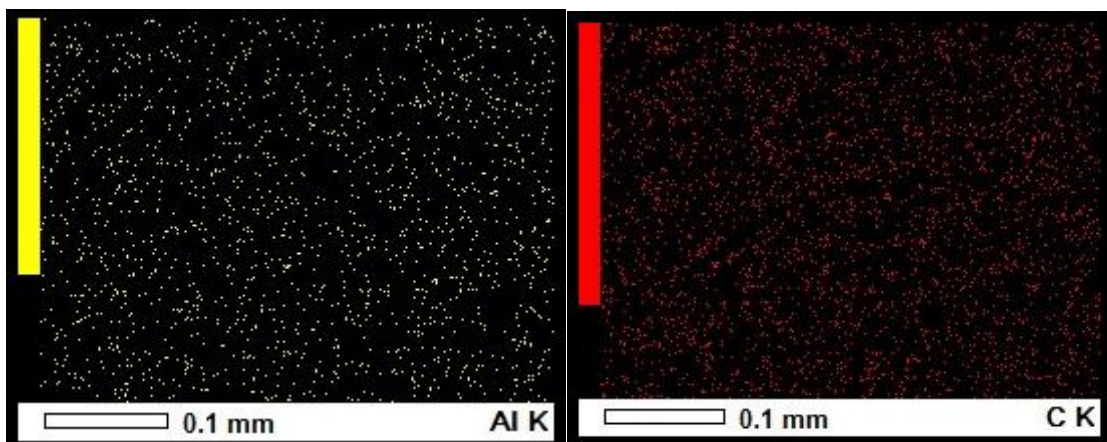
| Chemical formula | mass% | Atom% | Sigma | Net | K ratio | Line |
|------------------|--------|--------|-------|-------|-----------|------|
| C* | 1.72 | 3.97 | 0.01 | 3970 | 0.0003888 | K |
| O | 32.40 | 56.08 | 0.09 | 84176 | 0.0242463 | K |
| Al* | 1.18 | 1.21 | 0.08 | 1961 | 0.0005727 | K |
| P | 9.88 | 8.83 | 0.24 | 4706 | 0.0016382 | K |
| Ca | nd | nd | | | | |
| Ti* | 3.38 | 1.95 | 0.76 | 1182 | 0.0018734 | L |
| V* | 51.45 | 27.97 | 0.99 | 24845 | 0.0299016 | L |
| Total | 100.00 | 100.00 | | | | |

Figura 3 – Imagem representativa do mapeamento dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO pela técnica de EDS.



O mapa de cores da distribuição dos metais nos espécimes mostrou distribuição homogênea dos constituintes dos espécimes, uma vez que não foi observada qualquer concentração dos metais ou íons em toda a área analisada dos espécimes (Figuras 4 e 5)

Figura 4 - Mapa de cores mostrando a distribuição dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da Oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO) pela técnica de EDS.



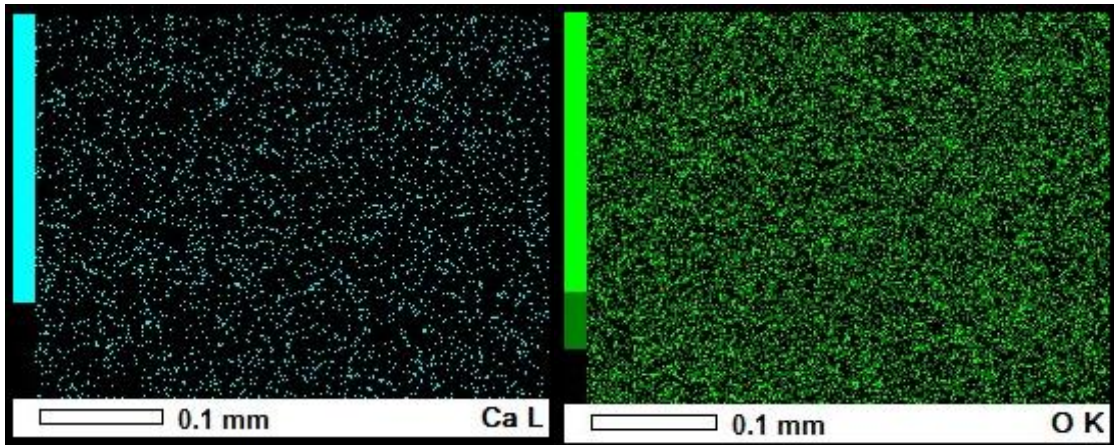
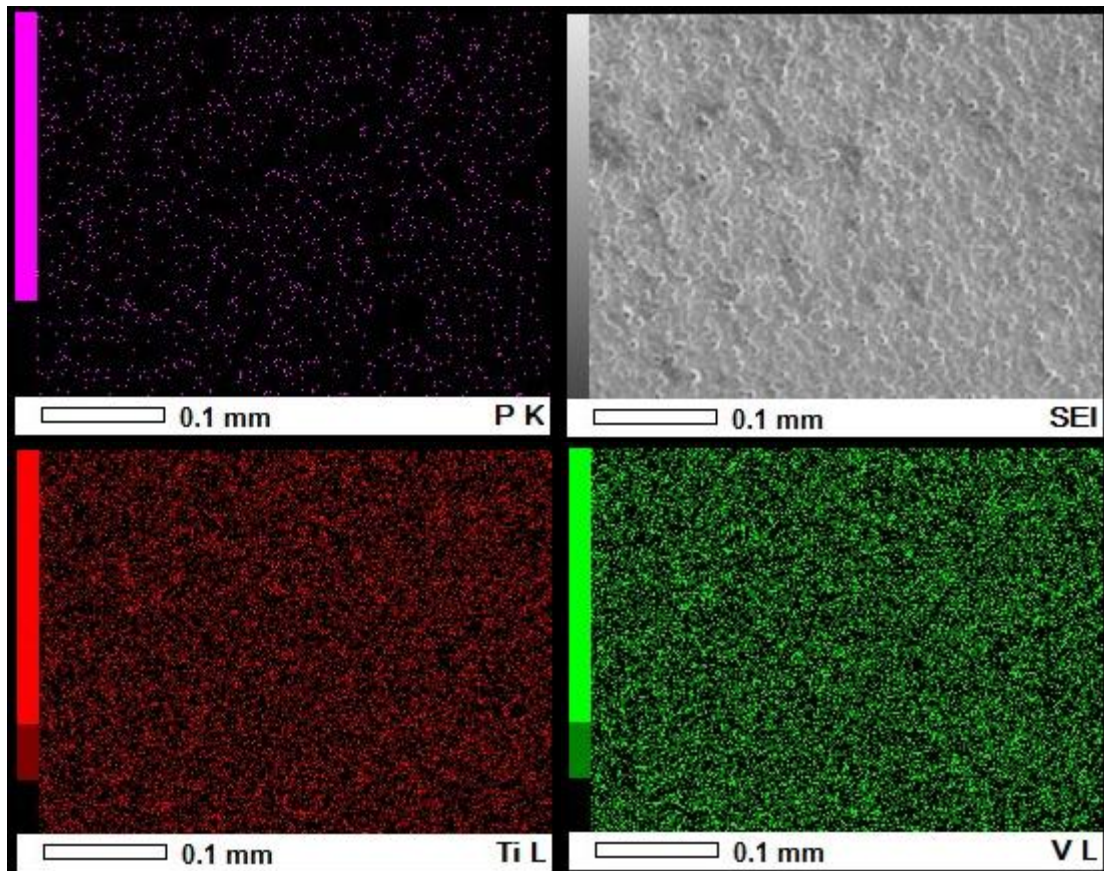


Figura 5 - Mapa de cores mostrando a distribuição dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da oxidação por plasma eletrolítico (PEO) pela técnica de EDS.



A energia livre de superfície dos espécimes analisados evidenciou variação dos resultados de $55,12 \pm 0,01$ a $61,17 \pm 0,01$. Estes valores sugerem que o processo de texturização empregado promove hidrofiliabilidade na superfície dos espécimes.

3.3. Indução da Osteoporose

Antes do início dos procedimentos experimentais *in vivo*, o estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FOA/UNESP, o qual apresentou aprovação por meio do parecer número 01040-2016 (Figura 6).

Figura 6 - Certificado do Comitê de ética no uso de animais (protocolo 01040-2016).

| | | |
|---|---|--|
|  | 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 | | |
| Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "A influência da texturização de superfície do Titânio comercialmente puro (Ticp) com incorporação de Ca e P produzida pela oxidação por plasma eletrolítico em ossos de baixa intensidade: Um estudo in vitro, ex-in vivo e in vivo", Processo FOA nº 01040-2016, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Dezembro de 2016. | | |
| VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Dezembro de 2019. | | |
| DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Janeiro de 2020. | | |
| CERTIFICATE | | |
| We certify that the study entitled "The influence of commercially pure Titanium (cpTi) coating with Ca and P incorporation produced by plasma electrolytic oxidation on low density bone: An in vitro, ex-in vivo and in vivo study", Protocol FOA nº 01040-2016, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 14, 2016. | | |
| VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 01, 2019. | | |
| DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 01, 2020. | | |
|  Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira Vice-Coordenador da CEUA CEUA Coordinator | | |
| <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> | | |

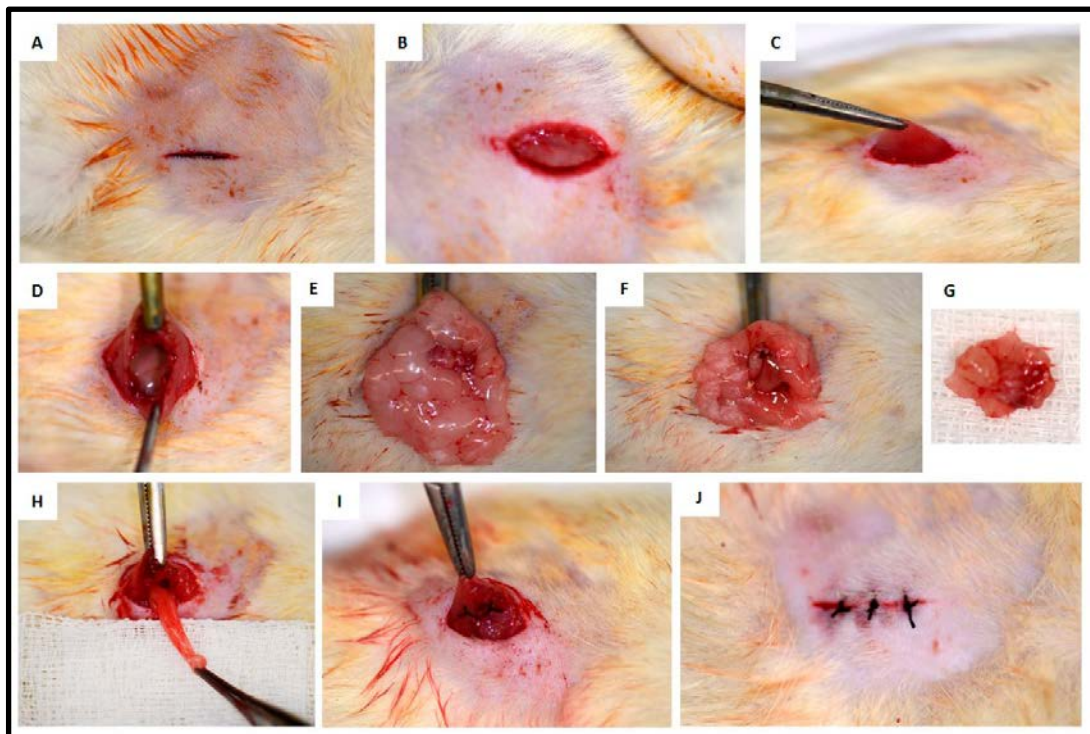
Assim, 20 ratas jovens adultas com 6 meses de idade (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), fêmeas, foram aleatoriamente divididas em dois grupos (n=10 por grupo) previamente determinadas (**ODN Sham e OBD Ovx**), com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma cepa mantida no Biotério do Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas, num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos.

Para a indução da osteoporose, simulando pacientes entre 25 e 30 anos de idade (77, 78) que já apresentam deficiência de estrógeno, hipogonadismo ou até mesmo que fizeram a cirurgia para histerectomia, ratas com 6 meses de idade foram submetidas à técnica de ovariectomia bilateral após o jejum pré-operatório. Antes disso, durante oito dias, que corresponde a 2 ciclos estrais regulares (ciclo estrogênio), as ratas foram submetidas ao esfregaço vaginal, de acordo com técnica descrita em estudos prévios (71, 74, 75, 80). As obtenções de células epiteliais através do esfregaço foram dispostas em lâminas histológicas e analisadas em microscópios ópticos. Com isso, durante os oito dias, a regularidade do ciclo estral foi avaliada. As ratas que não tiveram a regularidade entre as fases estrais (proestro, estro, metaestro e diestro) foram desconsideradas do estudo.

Após esta fase da pesquisa, as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral (grupo **OBD Ovx**). Estas foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e Cloridrato de Ketamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) e a seguir, foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, e foi realizada uma incisão de 1cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio afim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, os ovários e os chifres uterinos foram localizados e então laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryltm – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Nesta etapa os ovários foram removidos. O próximo passo caracterizou-se pela sutura por planos

com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryltm – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) nos planos mais profundos e fio Nylon 4-0 (Ethicontm – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) no plano superficial (Figura 7). As ratas do grupo saudável (osso de densidade normal: **ODN Sham**) passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos chifres uterinos e dos ovários sem suas respectivas laqueadura e remoção.

Figura 7 - Etapas cirúrgicas do procedimento de ovariectomia. (A) Incisão nos flancos das ratas. (B) Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos. (C) Acesso ao peritônio. (D) Incisão do peritônio e acesso a cavidade abdominal. (E) Localização do ovário e chifre uterino. (F) Laqueadura do chifre uterino. (G) Ovário removido. (H) Reposição dos tecidos laqueados. (I) Sutura dos planos internos. (J) Sutura do plano superficial.



Todos os animais continuaram no biotério sendo alimentadas com ração e água *ad libitum*, aguardando por mais um mês, completando o período de 90

dias após ovariectomia, que segundo a FDA americana, é o período que contempla a instalação da osteoporose em ratas.

3.4. Instalação de implantes

Após 90 dias da indução da osteoporose nas ratas jovens adultas (OBD Ovx e ODN Sham), todos os animais após jejum durante 12 horas prévias ao procedimento cirúrgico foram sedados pela combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam Cloridrato de Mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaïne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

Após a sedação dos animais, foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, anti-sepsia da região incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metáfise tibial esquerda e direita e a seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes.

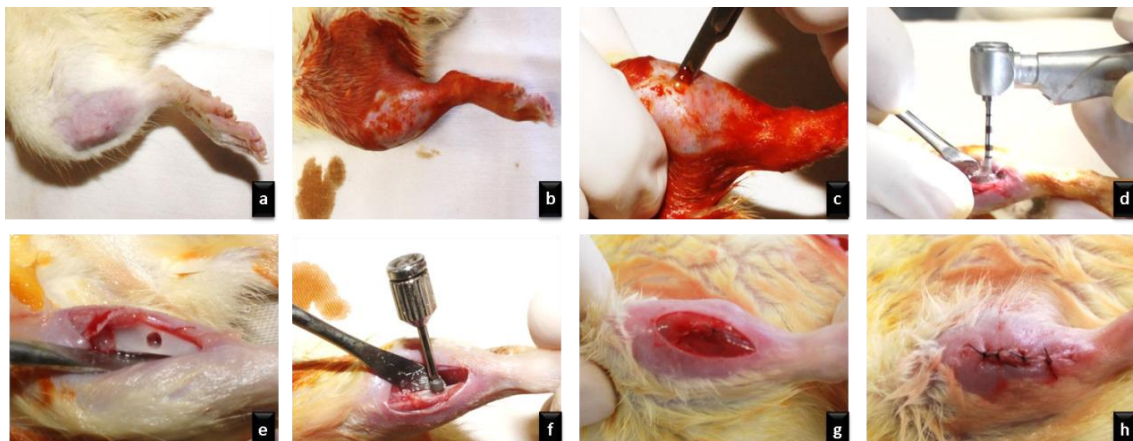
Assim, foram utilizados implantes de titânio comercialmente puro grau IV com superfície texturizada por duplo ataque ácido (ácidos nítrico, fluorídrico e sulfúrico), de acordo com os parâmetros da empresa do Setor que forneceram os implantes, ou implantes com superfície texturizada com PEO e incorporadas com CA/P. As dimensões dos implantes foram: diâmetro de 2,0 mm e altura de 4,0 mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,4 mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de Cloreto de Sódio a 0,9% (Fisiológico®),

Laboratórios Biosintética LTDA®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltentbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 3,0 mm, com travamento e estabilidade inicial (Figura 8).

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. Portanto, cada animal recebeu os dois implantes que foram testados neste estudo: com texturização controle (duplo ataque ácido) ou teste (PEO com incorporação de Ca/P). A escolha das tíbias para a instalação de implantes do grupo controle ou teste foi realizada de forma aleatória, por meio do website: www.randomization.com.

Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

Figura 8 – Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (a) Tricotomia na região de ambas as metáfises tibiais. (b) Antissepsia das regiões com PVPI. (c) Incisão de 1,5 cm de comprimento para acesso cirúrgico à metáfise tibial, seguida da divulsão dos planos. (d) Fresagem com lança fresa de 1,4 mm montada em motor convencional. (e) Preparo na metáfise tibial realizado. (f) Instalação dos implantes (2 mm x 4 mm) com rosqueamento digital. (g) Reposicionamento dos tecidos. (h) Sutura por planos anatômicos.



3.5. Análises do Reparo Ósseo Periimplantar

Processamento laboratorial para tecidos descalcificados (análise histológica e imunoistoquímica):

Os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica aos 42 dias após a instalação dos implantes, em que foram retiradas as áreas da região da cirurgia experimental para a realização da análise histológica dos cortes em parafina. Logo após a eutanásia, os animais tiveram as tíbias com os implantes instalados fixadas em formol e sofreram descalcificação em EDTA (10%). Neste momento, os implantes foram removidos por movimento anti-horário com chave digital hexagonal 1,2 mm. Assim, as peças foram desidratadas numa sequência de álcoois. Após estas etapas, foi realizada a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 5 µm de espessura e montados em lâminas. As lâminas pares após a microtomia foram destinadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e as ímpares para as reações de imunoistoquímica.

Imunoistoquímica:

Após a descalcificação dos tecidos periimplantares e confecção das lâminas histológicas que estavam incluídas em parafina, para as reações de imunoistoquímica, a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram Contra Fosfatase Resistente ao Tartarado (TRAP), Osteoprotegerina (OPG), Receptor Ativador do Fator Nuclear Kapa B Ligante (RANKL), Osteocalcina (OC) (Santa Cruz Biotechnology), para analisar as respostas celulares quanto ao processo de reabsorção óssea (TRAP), remodelação (OPG e RANKL) e mineralização (Osteocalcina).

Foi utilizado o anticorpo secundário biotinilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Para cada um dos anticorpos utilizados,

foi avaliada a expressão das proteínas semi-quantitativamente (análise qualitativa ordinal) pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo alveolar. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representam: ausência de marcação (0); marcação leve (1), marcação moderada (2) e marcação intensa (3), sendo consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos (Pedrosa, Okamoto et al. 2009, Manrique, Pereira et al. 2015) (Ramalho-Ferreira, Faverani, Momesso, Luvizuto, de Oliveira Puttini, Okamoto et al. 2016)

Análise biomecânica dos implantes (contra-torque):

Para a análise biomecânica, os animais deste grupo foram sedados com Cloridrato de Quetamina e Xilazina, 42 dias após a instalação dos implantes, e tiveram as metáfises das tíbias acessadas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Um monta-implante (Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e o torquímetro digital foi acoplado ao monta-implante.

Foi aplicado movimento anti-horário aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo-se completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton centímetro (N.cm).

3.6. Forma de análise dos resultados:

Os parâmetros quantitativos relacionados à análise biomecânica (torque-reverso) foram comparados em função das superfícies analisadas (PEO vs ácido) e em função dos tipos de osso (OBD Ovx vs OBD Sham). Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de homocedasticidade e normalidade (Shapiro-Wilk), em que dependendo da distribuição dos mesmos na curva de normalidade (distribuição homogênea ou heterogênea), foi aplicado o teste mais apropriado (paramétrico ou

não paramétrico). A análise histológica e imunohistoquímica foram realizadas de forma qualitativa, em que a histologia buscou verificar a citoarquitetura do tecido ósseo reparacional na comparação entre os grupos em função dos métodos de texturização e a imunohistoquímica, qualidade do tecido ósseo.

4. RESULTADOS

4.1 Análise Histológica:

As fotomicrografias histológicas mostraram que na região de interface correspondente as espiras dos implantes, houve neoformação de tecido ósseo, tanto para as ratas SHAM quanto para as ratas OVX. Os grupos AC para as ratas SHAM e OVX apresentaram neoformação de tecido ósseo nas porções mais altas (picos) da interface osso/implante, enquanto que nas porções mais baixas (vales) da interface osso/implante, notou-se atraso do reparo ósseo, com formação de tecido conjuntivo organizado, com menor formação de tecido ósseo quando comparado aos grupos PEO. Este grupo evidenciou maior neoformação óssea nas regiões de picos e vales, inclusive no grupo OVX.

Figura 9 – Fotomicrografias dos grupos experimentais (OBD OVX e ODN SHAM) em função dos métodos de texturização dos implantes (PEO e AC) (HE; Aumentos originais 6,3x, 12x, 25x e 40x).

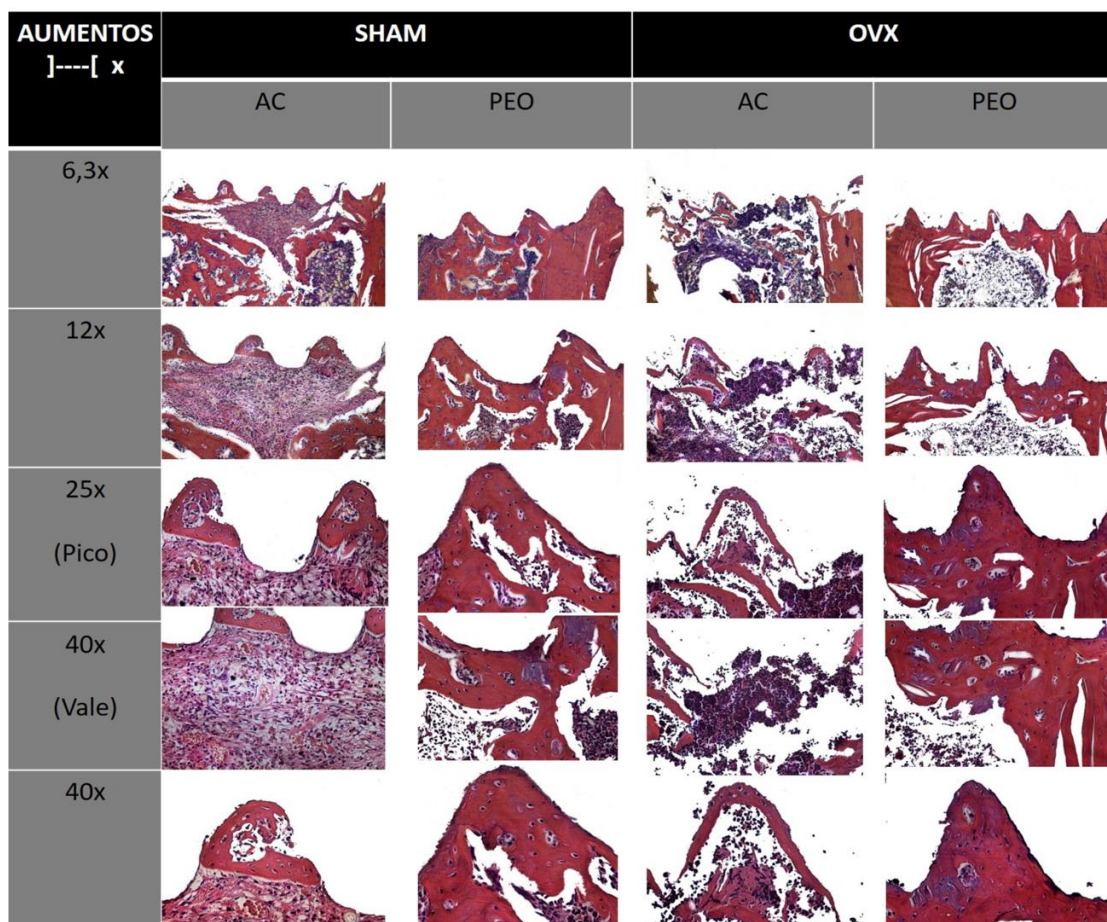
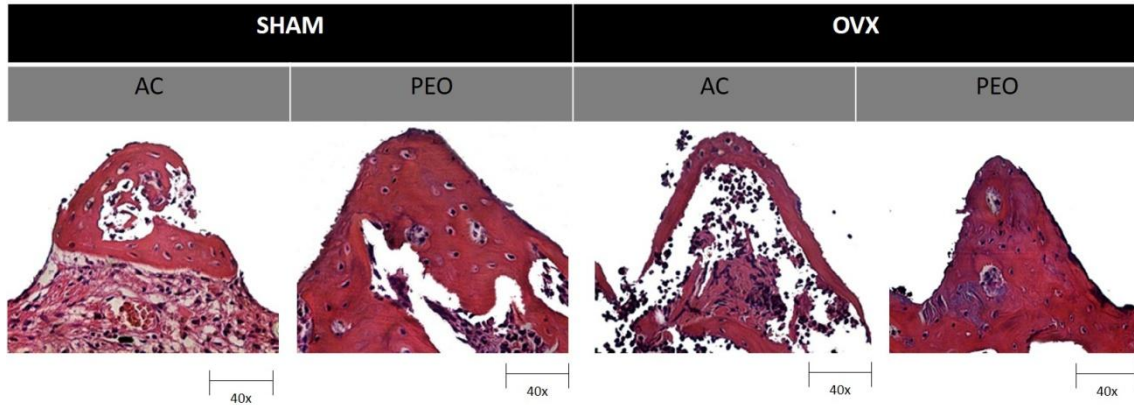


Figura 10 – Fotomicrografias em maior detalhe dos grupos experimentais (OBD OVX e ODN SHAM) em função dos métodos de texturização dos implantes (PEO e AC) (HE; Aumento original 40x).



4.2. Análise Imunoistoquímica

Foi realizada análise qualitativa ordinal, a partir da atribuição de escores, que representavam a área de imunomarcção positiva, de coloração acastanhada, para cada uma das proteínas avaliadas. Os escores atribuídos foram: 1 (marcação leve, onde até 25% da área avaliada apresentou marcação positiva), 2 (marcação moderada, onde até 50% da área avaliada apresentou marcação positiva), 3 (marcação intensa, onde até 75 % da área avaliada apresentou marcação positiva).

Grupo Sham AC: OPG (1) – Marcação leve nas células do tecido ósseo, junto às espiras dos implantes; RANKL (1-2) – Havia mais marcações do que o observado para OPG, no entanto, não foi possível caracterizar como moderada. OC (1) – Marcação leve, discreta nas células do tecido ósseo; TRAP (1-2) - Não chega a ser moderada, mas há uma quantidade importante de osteoclastos marcados positivamente.

Grupo Sham PEO: OPG (1) – Marcação leve, junto às células do tecido ósseo junto às espiras dos implantes; RANKL (2)- Marcação moderada, mostrado a presença desta proteína junto ao tecido ósseo em reparação; OC (1-2) - Conjuntivo marcado com Osteocalcina; TRAP (2) - Marcação moderada indicando importante presença de osteoclastos em atividade de reabsorção óssea.

Figura 11 – Fotomicrografias do grupo experimental OBD SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo SHAM AC: 1 (marcação leve); Grupo SHAM PEO: 1 (marcação leve). (Aumentos originais 12,5x e 40x).

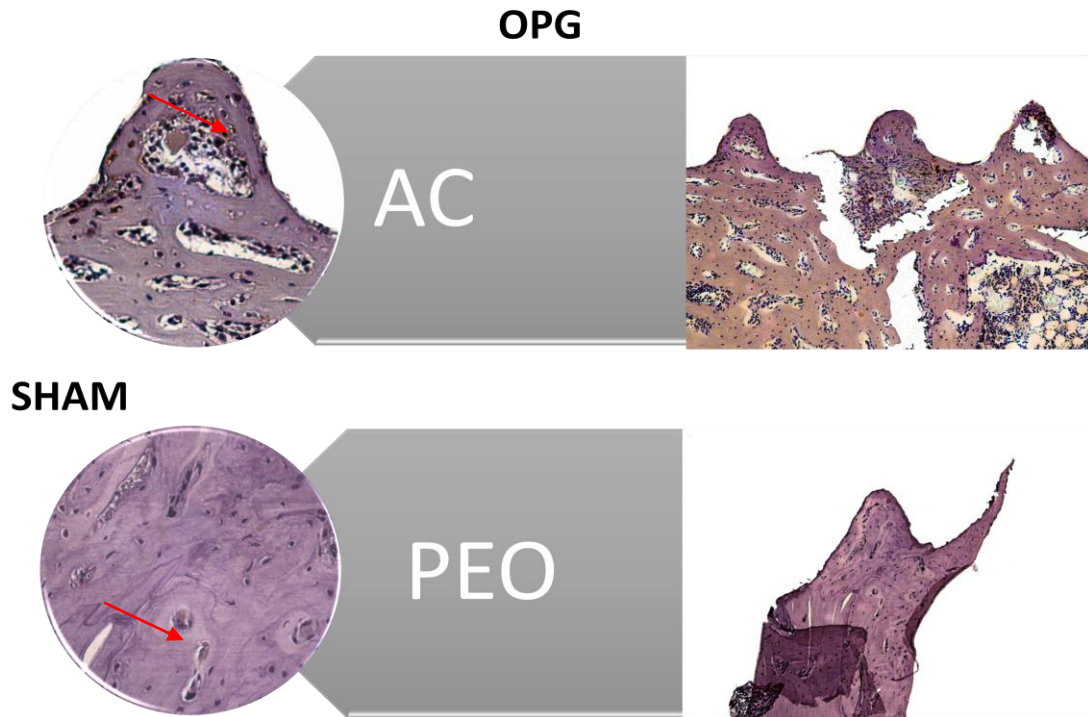


Figura 12 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína RANKL. Grupo SHAM AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo SHAM PEO: 2 (marcação moderada). (Aumentos originais 12,5x e 40x).

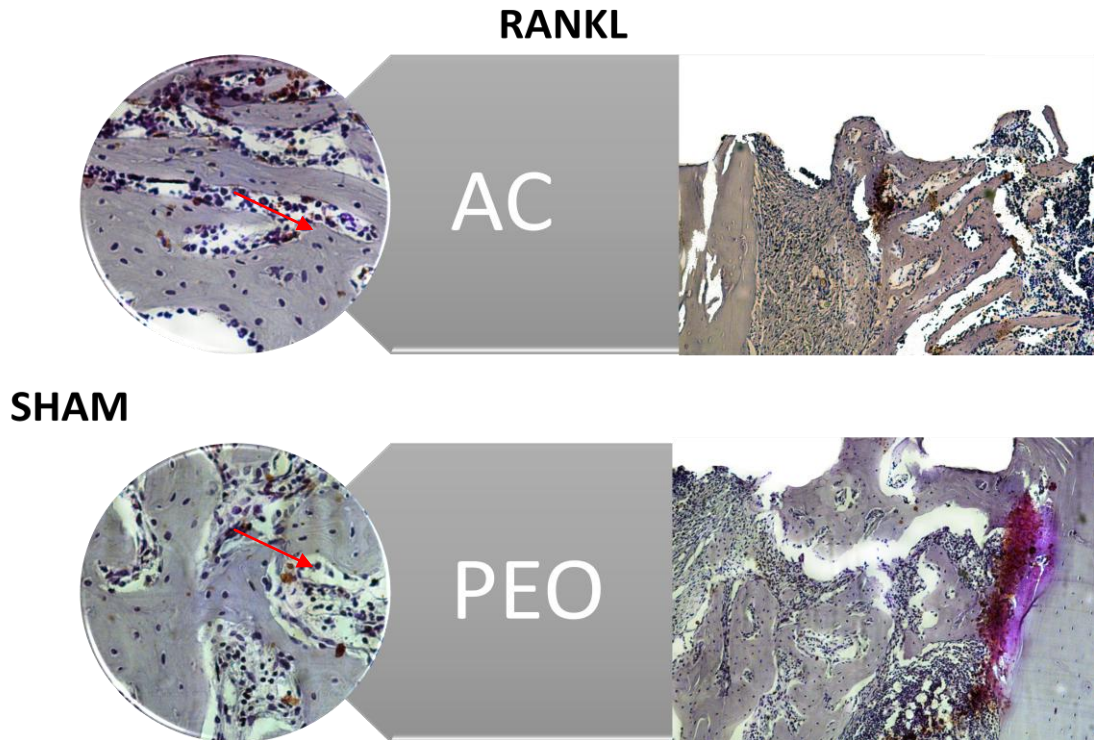


Figura 13 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo SHAM AC: 1 (marcação leve); Grupo SHAM PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). (Aumentos originais 12,5x e 40x).

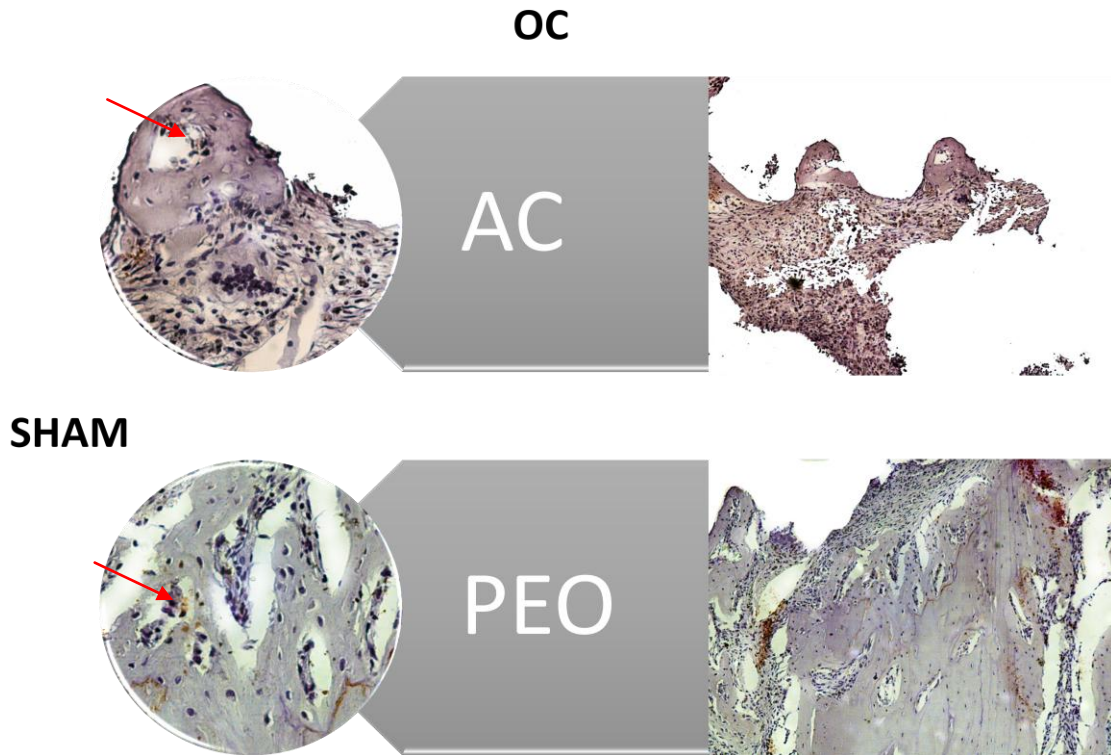
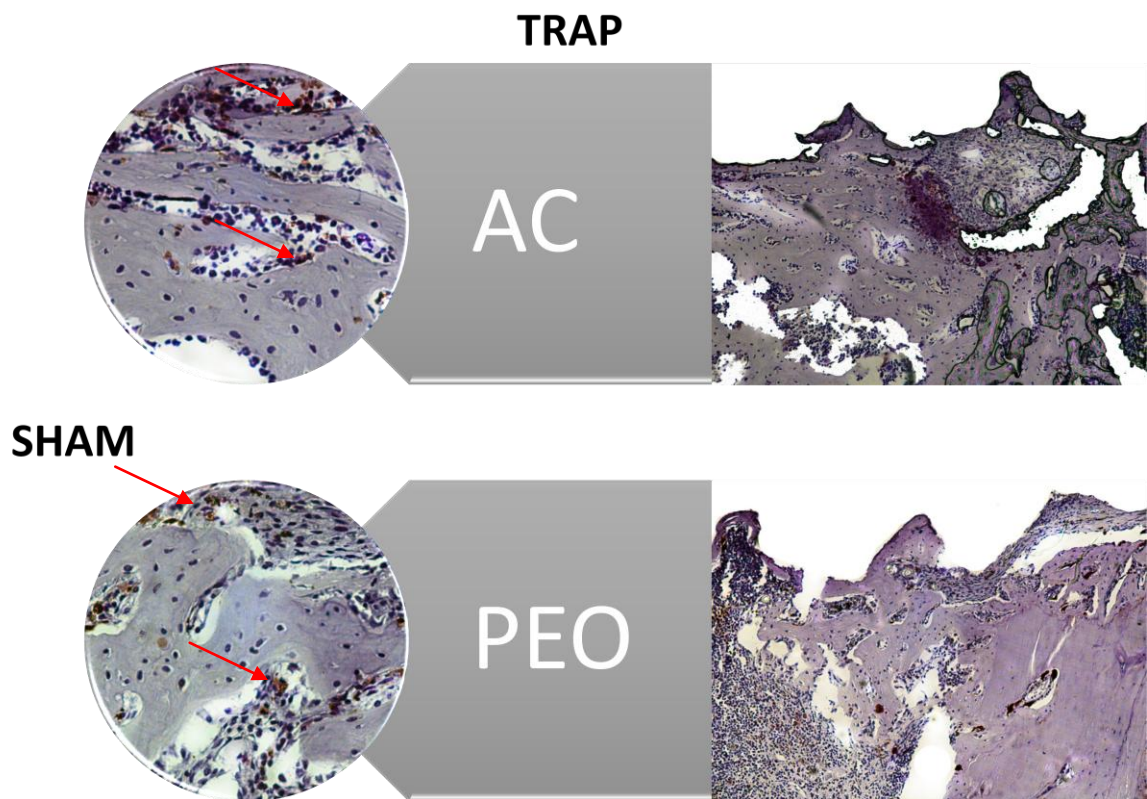


Figura 14 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína TRAP. Grupo SHAM AC: 1-2 (marcação de leve à moderada); Grupo SHAM PEO: 2 (marcação moderada). (Aumentos originais 12,5x e 40x).



Grupo Ovx AC: OPG (0-1) – marcação bastante discreta para esta proteína; RANKL (1) - discreta marcação para RANKL; OC (0-1) – marcação bastante discreta para esta proteína no campo analisado; TRAP (1-2) – marcação quase moderada para osteoclastos em atividade de reabsorção.

Grupo Ovx PEO – OPG (2) – marcação moderada para esta proteína, junto a osteoblastos próximos às espiras dos implantes; RANKL (0-1) - marcação ausente à leve na interface osso-implante; OC (1-2), marcação de leve a moderada para osteocalcina, mostrando importante marcação desta proteína no tecido ósseo em reparação; TRAP (1-2) – marcação quase moderada para osteoclastos em atividade de reabsorção.

Figura 15 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo OVX AC: 0-1 (marcação ausente à leve); Grupo OVX PEO: 2 (marcação moderada). (Aumentos originais 12,5x e 40x).

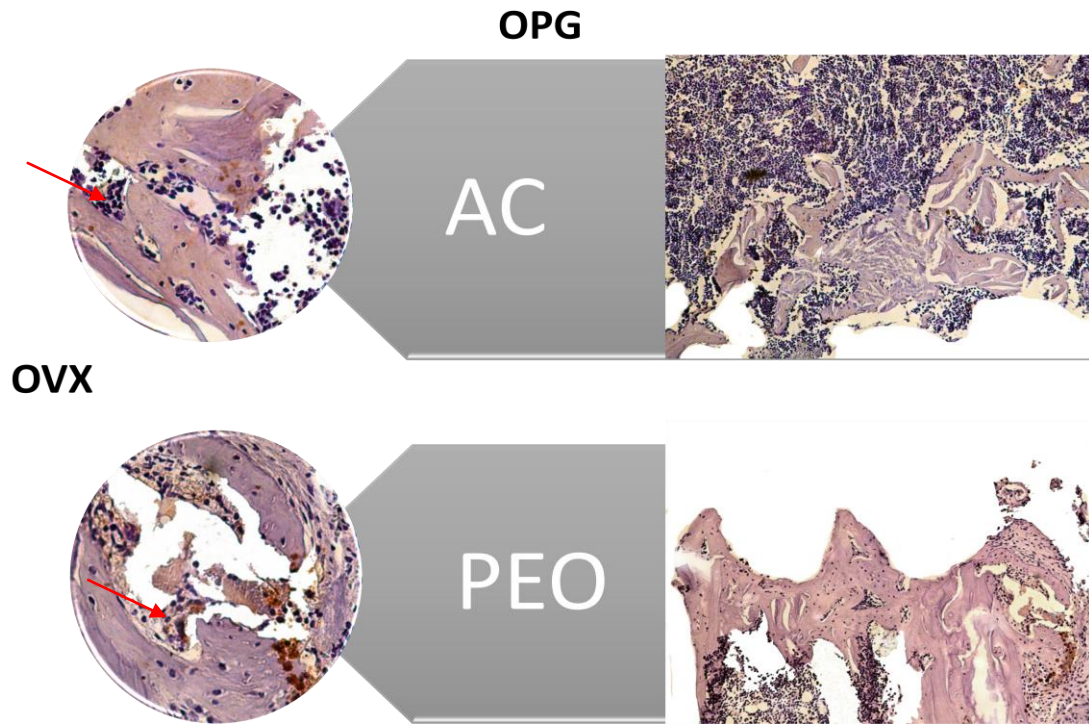


Figura 16 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína RANKL. Grupo OVX AC: 1 (marcação leve); Grupo OVX PEO: 0-1 (marcação ausente à leve). (Aumentos originais 12,5x e 40x).

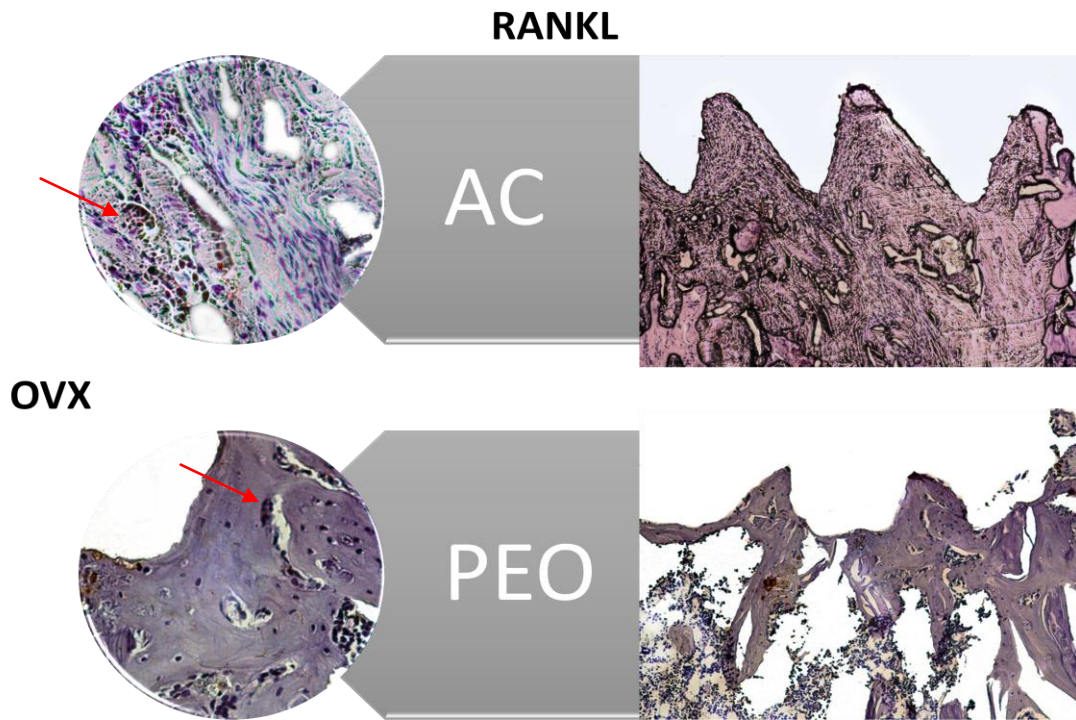


Figura 17 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo OVX AC: 0-1 (marcação ausente à leve); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). (Aumentos originais 12,5x e 40x).

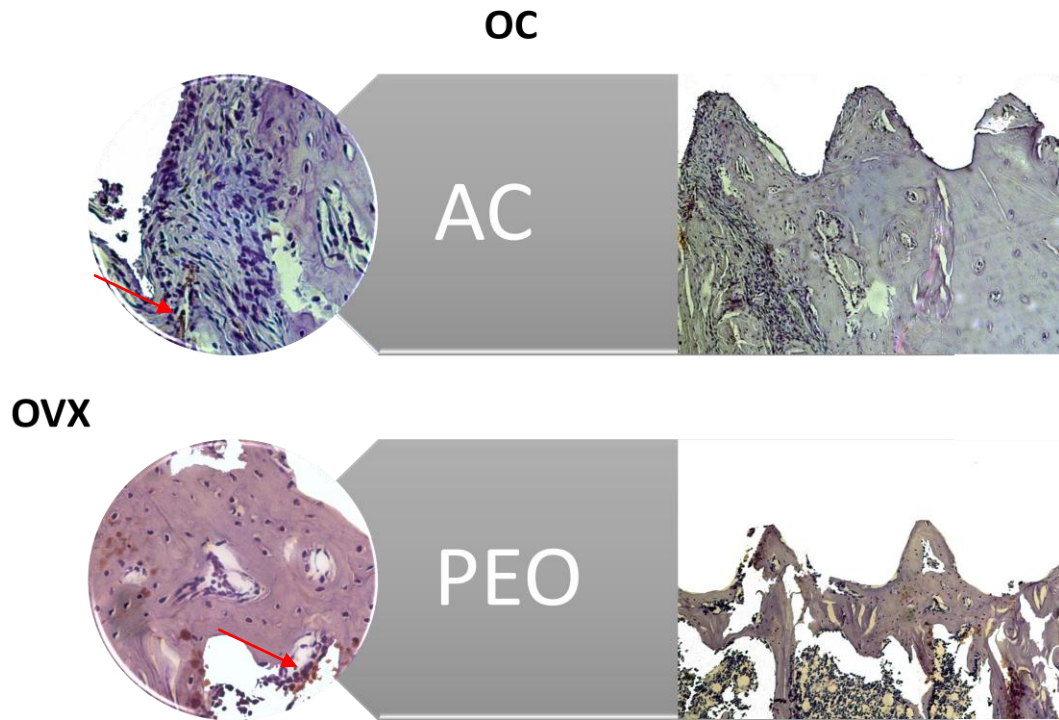


Figura 18 - Fotomicrografias do grupo experimental OBD OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcagem positiva para proteína TRAP. Grupo OVX AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). (Aumentos originais 12,5x e 40x).

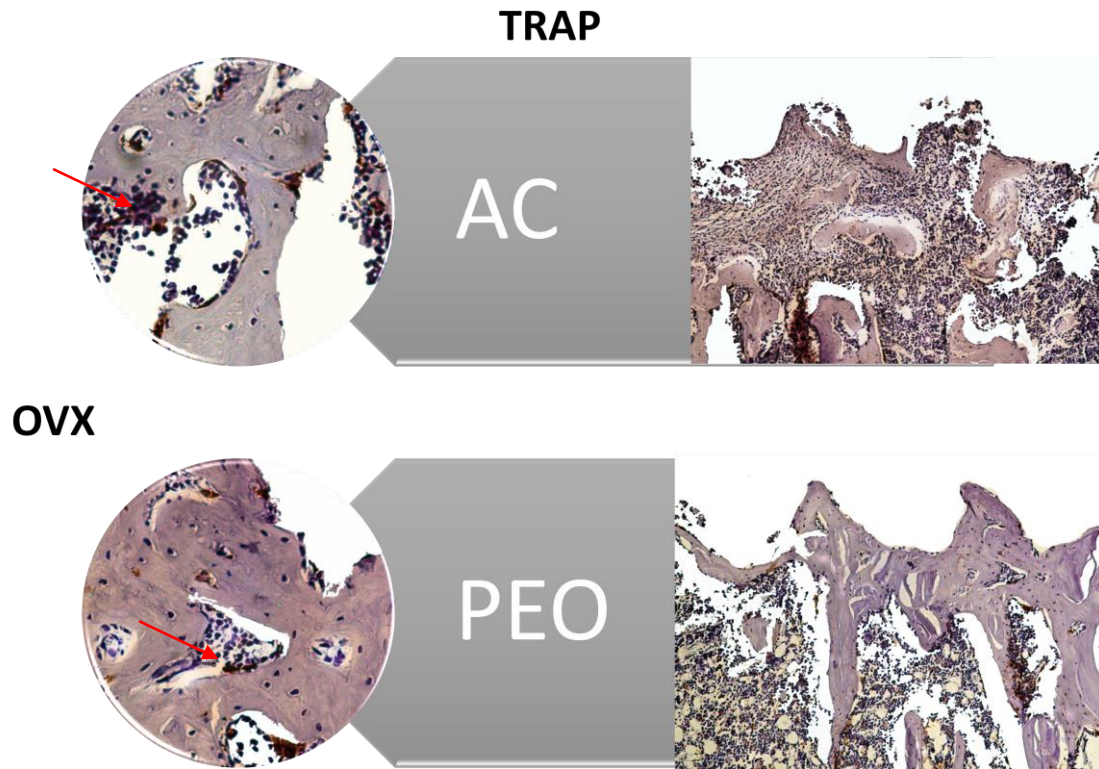


Tabela 2 – Representação dos escores atribuídos na análise imunoistoquímica para as proteínas OPG, RANKL, OC e TRAP para cada grupo experimental.

| Grupos | Proteínas | | | |
|----------|-----------|-------|-----|------|
| | OPG | RANKL | OC | TRAP |
| Sham AC | 1 | 1-2 | 1 | 1-2 |
| Sham PEO | 1 | 2 | 1-2 | 2 |
| Ovx AC | 0-1 | 1 | 0-1 | 1-2 |
| OVX PEO | 2 | 0-1 | 1-2 | 1-2 |

Houve melhor expressão das proteínas no grupo com texturização Sham PEO, devido à sinalização 1:2 das proteínas OPG e RANKL, respectivamente, refletindo no escore 2 para a TRAP. Assim, houve uma importante remodelação óssea, com atividade de reabsorção realizada pelos osteoclastos, seguida da ação de osteoblastos sintetizando matriz e neoformando osso. A mineralização representada pela proteína OC esteve mais imunomarcada em comparação ao grupo Sham AC.

Ovx AC obteve os piores resultados, do ponto de vista de metabolismo ósseo. Houve baixa atividade de OPG e RANKL, responsáveis pela remodelação óssea. A OC também recebeu o escore de 0-1, indicando que a sinalização de osteoclastos ativando osteoblastos ainda está baixa.

O grupo Ovx PEO, observou-se que houve maior ativação da OPG (2), levando a uma maior taxa de atividade da TRAP (2). Assim, na análise imunohistoquímica, a texturização PEO melhorou a resposta reparacional junto aos implantes instalados.

4.3. Análise Biomecânica (Contra-torque):

Análise estatística:

Para os dados de torque reverso (análise biomecânica), o programa computacional Sigma Plot 12.3 (Data and Graph Analysis, San Jose, CA, EUA) foi utilizado, considerando $p < 0,05$ como nível de significância. Inicialmente, o teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado, o qual mostrou homogeneidade dos resultados ($p > 0,05$). Assim, o teste t foi realizado para a comparação das variáveis independentes (grupos experimentais - 2 níveis (OVX e SHAM) e técnicas de texturização - 2 níveis (PEO e AC). Para as interações com significância estatística, o teste Tukey foi realizado.

Resultados Torque reverso:

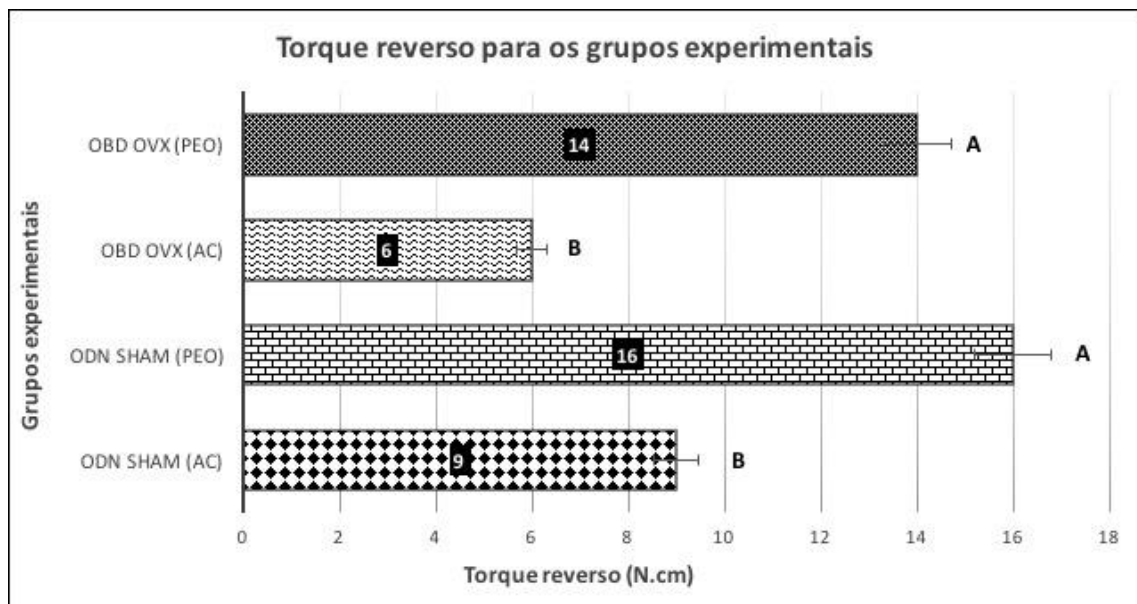
Na análise intragrupos, os valores de torque reverso (N.cm) foram maiores para os grupos PEO em comparação aos grupos AC ($p < 0,05$), independentemente

do grupo experimental (OBD OVX ou ODN SHAM).

Assim, os maiores valores foram observados nos grupos ODN SHAM PEO ($x=16$ N.cm) e ODN SHAM PEO ($x=14$ N.cm), seguidos dos grupos ODN SHAM ($x=9$ N.cm) e OBD OVX AC ($x=6$ N.cm) (OBD OVX PEO=ODN SHAM PEO>ODN SHAM AC=OBD OVX AC) (Figura 11).

Gráfico 1 – Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão de torque reverso (N.cm) para os grupos experimentais (OBD OVX e ODN SHAM, PEO e AC).

* Letras maiúsculas diferentes denotam valores de $p<0,05$. Letras maiúsculas iguais denotam valores de $p>0,05$.



5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo foram esclarecedores para aceitar a hipótese que o método de texturização aqui testado, por meio da Oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO), favoreceu à osteocondução do processo de reparo ósseo periimplantar, tanto nas ratas com osteoporose induzida (OVX) quanto nas ratas com metabolismo ósseo inalterado (SHAM).

A engenharia tecidual desenvolve periodicamente novas técnicas de texturização com o objetivo de melhorar respostas biológicas da osseointegração dos implantes e também características estruturais. Neste contexto, ainda na fase de testes experimentais *in vitro*, o método testado (PEO) demonstrou melhoramento das características mecânicas, térmicas, corrosivas e tribocorrosivas do titânio (37-39). O presente estudo foi encorajado por meio das investigações *in vivo* de Marques (2015), em que foram realizados testes para a padronização de concentrações ideais de íons Ca e P na superfície do titânio e foi observado que a bioatividade do método de texturização promovia melhor proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, e, por conseguinte, poderia contribuir para a osseointegração.

Independente da análise realizada nesta pesquisa (histologia, imunistoquímica e biomecânica), a texturização dos implantes com PEO se mostrou superior em todos os parâmetros analisados. É importante salientar que a texturização convencionalmente disponibilizada no mercado (AC) também foi capaz de promover neoformação de tecido ósseo na interface osso/implante, entretanto, em especial, quando se avaliou o comportamento nos ossos de baixa densidade, como simulado na presente pesquisa (OVX), a resposta reparacional foi substancialmente superior dos grupos PEO, inclusive com superioridade estatística no contra-torque dos implantes ($p < 0,05$) e com maior área de imunomarcção da proteína osteocalcina para estes grupos, mostrando um osso com maior maturação.

Esta superioridade ficou claramente evidenciada na análise histológica da interface osso/implante, que nos grupos texturizados com PEO, a neoformação de osso foi encontrada em grande parte das regiões periimplantares, tanto nas regiões correspondentes aos “picos” quanto nas depressões (“vales”) em contato com as

espiras dos implantes. Nas regiões de maior depressão da interface osso/implante, inclusive no osso osteoporótico, os grupos PEO foram capazes de osteoconduzir a formação de tecido ósseo, diferentemente dos outros grupos texturizados com AC, os quais nestas regiões mais longes da interface osso/implante havia atraso do reparo ósseo, com tecido gorduroso ainda presente.

Semelhantemente como observado neste estudo, em ratas com osteoporose induzida e que receberam implantes com texturização convencionalmente disponibilizada pelo mercado (AC), somente quando medicamentos para tratamento de osteoporose com propriedades de melhorar a qualidade do tecido ósseo foram utilizados, tal como o cloridrato de raloxifeno, o reparo ósseo foi bastante favorável (67, 73). Assim, o princípio de bioatividade deste método de texturização foi alcançado com êxito e deve ser complementado com estudos futuros, por meio de análises da microestrutura do tecido ósseo pela microtomografia computadorizada, da dinâmica e histometria óssea, através dos tecidos calcificados.

A eleição dos grupos SHAM e OVX se fundamentou na necessidade de comparação das variáveis relacionadas aos métodos de texturização testados neste trabalho (AC e PEO), frente aos diferentes comportamentos biológicos do tecido ósseo comprometido pela redução da densidade óssea na osteoporose e no osso saudável. Assim, a hipótese dos autores seria que, caso o método de texturização testado conseguisse estimular a formação do tecido ósseo periimplantar, inclusive nos ossos de baixa densidade, o objetivo seria alcançado.

6. CONCLUSÃO

Portanto, diante das limitações desta investigação *in vivo*, foi possível concluir que os resultados são encorajadores para a técnica de texturização por PEO e devem ser suplementados por análises estruturais e biológicas para futuras aplicações na clínica cirúrgica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Takebe J, Itoh S, Okada J, Ishibashi K. Anodic oxidation and hydrothermal treatment of titanium results in a surface that causes increased attachment and altered cytoskeletal morphology of rat bone marrow stromal cells in vitro. *Journal of biomedical materials research*. 2000;51(3):398-407.
2. Niinomi M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Materials Science and Engineering: A*. 1998;243(1):231-6.
3. Combe E. A protocol for determining the surface free energy of dental materials. *Dental Materials*. 2004;20(3):262-8.
4. Barao VA, Mathew MT, Assuncao WG, Yuan JC, Wimmer MA, Sukotjo C. The role of lipopolysaccharide on the electrochemical behavior of titanium. *J Dent Res*. 2011;90(5):613-8.
5. Salido M, Vilches JI, Gutierrez JL, Vilches J. Actin cytoskeletal organization in human osteoblasts grown on different dental titanium implant surfaces. *Histol Histopathol*. 2007;22(12):1355-64.
6. 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(3):173-80.
7. Tavares MG, de Oliveira PT, Nanci A, Hawthorne AC, Rosa AL, Xavier SP. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(4):452-8.
8. Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(2):128-34.
9. Buser D, Brogini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*. 2004;83(7):529-33.
10. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20 Suppl 4:172-84.
11. Lin A, Wang CJ, Kelly J, Gubbi P, Nishimura I. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(5):808-16.
12. Gupta A, Dhanraj M, Sivagami G. Status of surface treatment in endosseous implant: a literary overview. *Indian J Dent Res*. 2010;21(3):433-8.
13. Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol*. 2003;74(7):945-56.

14. Oliveira NT, Guastaldi FP, Perrotti V, Hochuli-Vieira E, Guastaldi AC, Piattelli A, et al. Biomedical Ti-Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013;15(3):427-37.
15. Queiroz TP, Souza FA, Guastaldi AC, Margonar R, Garcia IR, Hochuli-Vieira E. 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 Implan Res.* 2013;24(8):896-903.
16. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1 - Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *International Journal of Prosthodontics.* 2004;17(5):536-43.
17. Zechner W, Tangl S, Furst G, Tepper G, Thams U, Mailath G, et al. Osseous healing characteristics of three different implant types - A histologic and histomorphometric study in mini-pigs. *Clin Oral Implan Res.* 2003;14(2):150-7.
18. Souza FA, Queiroz TP, Guastaldi AC, Garcia R, Magro O, Nishioka RS, et al. 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.* 2013;101B(1):76-84.
19. Menhal Shbeh M, Yerokhin A, Goodall R. Microporous Titanium through Metal Injection Moulding of Coarse Powder and Surface Modification by Plasma Oxidation. *Applied Sciences.* 2017;7(1):105.
20. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468-86.
21. Ciobanu G, Ciobanu O. Investigation on the effect of collagen and vitamins on biomimetic hydroxyapatite coating formation on titanium surfaces. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(3):1683-8.
22. Rosa AL, Crippa GE, de Oliveira PT, Taba M, Jr., Lefebvre LP, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(5):472-81.
23. Schwartz FO, Novaes AB, Jr., de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(3):333-44.
24. Messer RLW, Tackas G, Mickalonis J, Brown Y, Lewis JB, Wataha JC. Corrosion of Machined Titanium Dental Implants Under Inflammatory Conditions. *J Biomed Mater Res B.* 2009;88B(2):474-81.
25. Faverani LP, Assuncao WG, de Carvalho PS, Yuan JC, Sukotjo C, Mathew MT, et al. Effects of dextrose and lipopolysaccharide on the corrosion behavior of a

Ti-6Al-4V alloy with a smooth surface or treated with double-acid-etching. *PLoS One*. 2014;9(3):e93377.

26. Faverani LP, Barao VA, Pires MF, Yuan JC, Sukotjo C, Mathew MT, et al. Corrosion kinetics and topography analysis of Ti-6Al-4V alloy subjected to different mouthwash solutions. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;43:1-10.

27. Barao VA, Ricomini-Filho AP, Faverani LP, Del Bel Cury AA, Sukotjo C, Monteiro DR, et al. The role of nicotine, cotinine and caffeine on the electrochemical behavior and bacterial colonization to cp-Ti. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;56:114-24.

28. Faverani LP, Barao VA, Ramalho-Ferreira G, Ferreira MB, Garcia-Junior IR, Assuncao WG. Effect of bleaching agents and soft drink on titanium surface topography. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(1):22-30.

29. Liu P, Zhao Y, Yuan Z, Ding H, Hu Y, Yang W, et al. Construction of Zn-incorporated multilayer films to promote osteoblasts growth and reduce bacterial adhesion. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;75:998-1005.

30. Luo W, Zhao J, Meng X, Ma S, Sun Q, Guo T, et al. [Effect of Zinc Doped Calcium Phosphate Coating on Bone Formation and the Underlying Biological Mechanism]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2015;32(6):1359-63.

31. Ferreira Ribeiro C, Cogo-Muller K, Franco GC, Silva-Concilio LR, Sampaio Campos M, de Mello Rode S, et al. Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Arch Oral Biol*. 2016;69:33-9.

32. Mendes MWD, Agreda CG, Bressiani AHA, Bressiani JC. A new titanium based alloy Ti-27Nb-13Zr produced by powder metallurgy with biomimetic coating for use as a biomaterial. *Mat Sci Eng C-Mater*. 2016;63:671-7.

33. A. Krzakala AK-K, and W. Simka. Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys. *RSC Adv*. 2013;3:19725.

34. Laurindo CA, Torres RD, Mali SA, Gilbert JL, Soares P. Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;37:223-31.

35. A. L. Yerokhin XN, A. Leyland, A. Matthews, and S. J. Dowey. Plasma electrolysis for surface engineering. *Surface and Coatings Technology*. 1999;122(2-3):73-93.

36. F. C. Walsh CTJL, R. J. K. Wood, K. T. Stevens, J. Archer, A. R. Poeton, and A. Ryder. Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al, Mg, Ti) alloys. *Transactions of the IMF: The International Journal of Surface Engineering and Coatings*. 2009;87(3):122-35.

37. Akatsu T, Yamada Y, Hoshikawa Y, Onoki T, Shinoda Y, Wakai F. . *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(8):4871-5.

38. Marques Ida S dCN, Landers R, Yuan JC, Mesquita MF, Sukotjo C, Mathew MT, Barão VA. Incorporation of Ca, P, and Si on bioactive coatings produced by plasma electrolytic oxidation: The role of electrolyte concentration and treatment duration. *Biointerphases*. 2015;10(4):041002.
39. Marques ID, Barao VA, da Cruz NC, Yuan JC, Mesquita MF, Ricomini-Filho AP, et al. Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application. 2015;100:133-46.
40. de Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A*. 2007;80(3):554-64.
41. Tambasco de Oliveira P, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004;25(3):403-13.
42. Wan P, Tan L, Yang K. Surface Modification on Biodegradable Magnesium Alloys as Orthopedic Implant Materials to Improve the Bio-adaptability: A Review. *Journal of Materials Science & Technology*. 2016;32(9):827-34.
43. Lu X, Mohedano M, Blawert C, Matykina E, Arrabal R, Kainer KU, et al. Plasma electrolytic oxidation coatings with particle additions – A review. *Surface and Coatings Technology*. 2016;307:1165-82.
44. Zaporozhets TS, Puz AV, Sinebryukhov SL, Gnedenkov SV, Smolina TP, Besednova NN. Biocompatibility of Modified Osteoinductive Calcium-Phosphate Coatings of Metal Implants. *Bull Exp Biol Med*. 2017;162(3):366-9.
45. Su Y, Komasa S, Li P, Nishizaki M, Chen L, Terada C, et al. Synergistic effect of nanotopography and bioactive ions on peri-implant bone response. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:925-34.
46. Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 2006;85(7):584-95.
47. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 2006;85(7):596-607.
48. Briot K, Geusens P, Em Bultink I, Lems WF, Roux C. Inflammatory diseases and bone fragility. *Osteoporos Int*. 2017 Sep 15. doi: 10.1007/s00198-017-4189-7. [Epub ahead of print] Review.
49. He J, Zhao B, Deng C, Shang D, Zhang C. Assessment of implant cumulative survival rates in sites with different bone density and related prognostic factors: an 8-year retrospective study of 2,684 implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30(2):360-71.
50. Hurst D. Evidence unclear on whether Type I or II diabetes increases the risk of implant failure. *Evid Based Dent*. 2014;15(4):102-3.

51. Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Diabetes and oral implant failure: a systematic review. *J Dent Res*. 2014;93(9):859-67.
52. Pedrosa WF, Jr., Okamoto R, Faria PE, Arnez MF, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(11):1254-64.
53. Francucci CM, Ghigo E, Boscaro M. Endocrinopathy-induced osteoporosis. Impact on health and economics of osteoporosis. *J Endocrinol Invest*. 2010;33(7 Suppl):2-3.
54. Harvey N, Dennison E, Cooper C. Osteoporosis: impact on health and economics. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(2):99-105.
55. LeRoith D. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Pediatric endocrinology. Foreword. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012;41(4):xi-xiii.
56. Rapaport R. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Pediatric endocrinology. Preface. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012;41(4):xv-xvi.
57. LeRoith D. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Neuroendocrine control of metabolism. Foreword. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013;42(1):xi-xiii.
58. Aguilar EA, Barry SD, Cefalu CA, Abdo A, Hudson WP, Campbell JS, et al. Osteoporosis Diagnosis and Management in Long-Term Care Facility. *Am J Med Sci*. 2015;350(5):357-63.
59. Lehnert H. [Underestimated osteoporosis: New directions in diagnosis and therapy]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2015;140(22):1660.
60. Zhou B, Lu Y, Hajifathalian K, Bentham J, Di Cesare M, Danaei G, et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet*. 2016;387(10027):1513-30.
61. Evans HM, Long JA. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1922;8(3):2.
62. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
63. Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microscopy Research and Technique*. 1996;33(2):214-31.
64. de Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem*. 2003;51(5):633-41.

65. Dvorak G, Fugl A, Watzek G, Tangl S, Pokorny P, Gruber R. Impact of dietary vitamin D on osseointegration in the ovariectomized rat. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(11):1308-13.
66. Kuchler U, Luvizuto ER, Munoz F, Hofbauer J, Watzek G, Gruber R. Bone healing around titanium implants in two rat colitis models. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(2):224-9.
67. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR, Jr., Okamoto R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(6):798-805.
68. Harrasser N, Gorkotte J, Obermeier A, Feihl S, Straub M, Slotta-Huspenina J, et al. A new model of implant-related osteomyelitis in the metaphysis of rat tibiae. *BMC musculoskeletal disorders.* 2016;17(1):152.
69. Sirolli M, Mafra CE, Santos RA, Holzhausen LS, Cesar JBN. Influence of Piezosurgery on Bone Healing around Titanium Implants: A Histological Study in Rats. *Braz Dent J.* 2016;27(3):278-83.
70. Glosel B, Kuchler U, Watzek G, Gruber R. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25(3):516-24.
71. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt.* 2015;20(3):038003.
72. Rendina E, Hembree KD, Davis MR, Marlow D, Clarke SL, Halloran BP, et al. Dried plum's unique capacity to reverse bone loss and alter bone metabolism in postmenopausal osteoporosis model. *PLoS One.* 2013;8(3):e60569.
73. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GA, Luvizuto ER, de Oliveira Puttini I, Okamoto R. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clin Oral Investig.* 2016.
74. Luvizuto ER, Dias SM, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR, Jr., Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone.* 2010;46(4):1021-9.
75. Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SM, Okamoto T, Dornelles RC, Garcia IR, Jr., et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol.* 2010;55(1):52-9.
76. Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, Sanchez Mdel P, Okamoto T, Okamoto R, et al. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Investig.* 2015;19(6):1319-27.

77. Andreollo NA, Santos EF, Araujo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD - Brazilian archives of digestive surgery*. 2012;25(1):49-51.
78. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. 2013;4(6):624-30.
79. Lara Rodriguez L, Sundaram PA, Rosim-Fachini E, Padovani AM, Difffoot-Carlo N. Plasma electrolytic oxidation coatings on gammaTiAl alloy for potential biomedical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(5):988-1001.
80. Evans HM, Long JA. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1922;8(3):38-9.