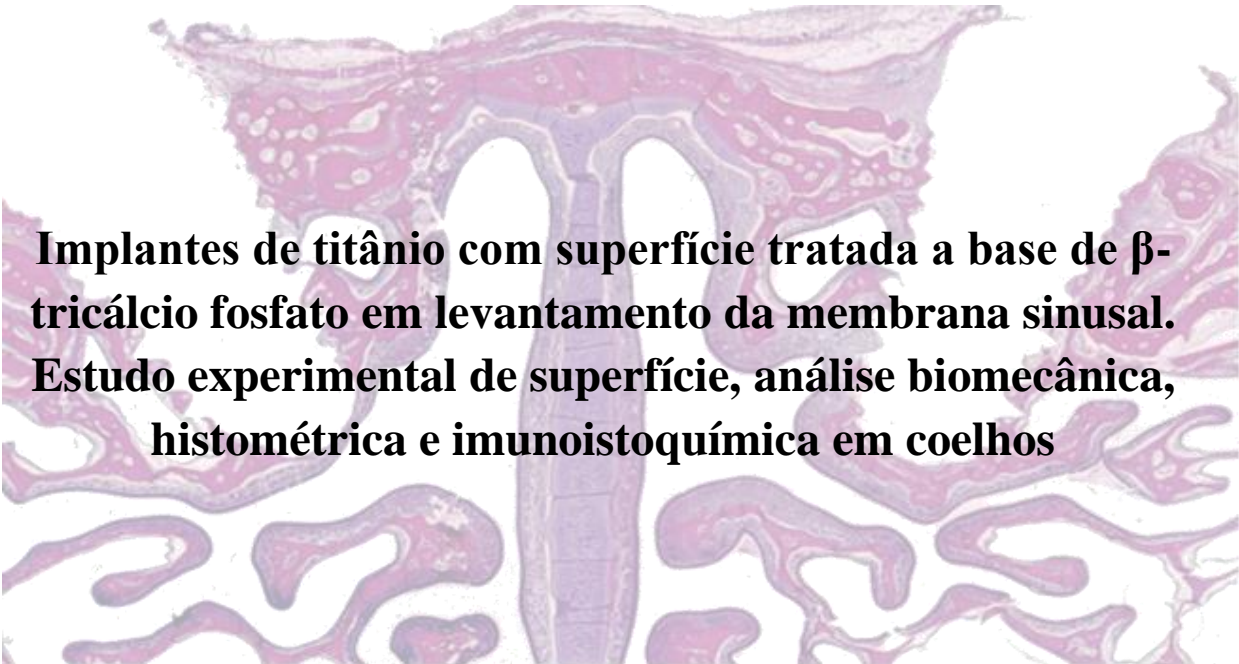


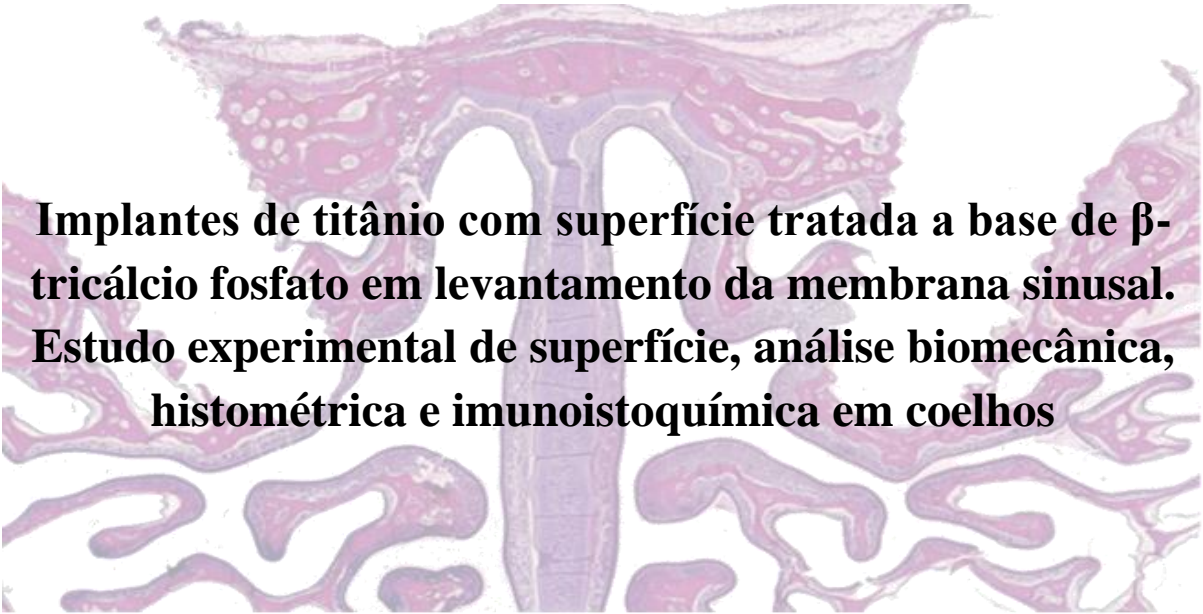
Ana Paula Simões Corrêa

A histological section of a rabbit sinus membrane, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows a cross-section of the sinus membrane, which is a thin, multi-layered structure. The central part of the membrane is thicker and contains a network of blood vessels and connective tissue. The edges of the membrane are thinner and more delicate. The overall appearance is that of a complex, vascularized tissue structure.

Implantes de titânio com superfície tratada a base de β -tricálcio fosfato em levantamento da membrana sinusal. Estudo experimental de superfície, análise biomecânica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos

ARAÇATUBA – SP
2018

Ana Paula Simões Corrêa



Implantes de titânio com superfície tratada a base de β -tricálcio fosfato em levantamento da membrana sinusal. Estudo experimental de superfície, análise biomecânica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - FOA, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Odontologia (área de concentração Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial).

Orientador: Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior.

Coorientador: Prof. Dr. Francisley Ávila Souza.

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586p Corrêa, Ana Paula Simões.
Implantes de titânio com superfície tratada a base de β -tricálcio fosfato em levantamento da membrana sinusal : estudo experimental de superfície, análise biomecânica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos / Ana Paula Simões Corrêa. – Araçatuba, 2018
109 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Implantes dentários 2. Fosfatos de cálcio 3. Seio maxilar I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por ser a inteligência suprema e causa primária de todas as coisas.

Onipresente, Onipotente, Onisciente...

Aos Meus Pais e Irmã,

Ana Flávia Simões Corrêa, Paulo Sérgio de Miranda Corrêa (in memoriam) e Jéssica Maria Simões Corrêa por todo o amor, carinho, compreensão, confiança e dedicação. A minha mãe por ser mãe e pai. A minha irmã por sua compreensão e companheirismo. Aos meus pais e irmã por serem as pessoas que mais amo nesse mundo.

Amo muito vocês incondicionalmente...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Amazonas- FAPEAM,

Pelo financiamento deste projeto de pesquisa. Sendo assim, foi possível dirimir as dificuldades para a sua execução e conclusão e por fim, a viabilização da obtenção do meu título de Doutor em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial.

Obrigada...

Aos Meus Orientadores Idelmo Rangel Garcia Júnior, Francisley Ávila Souza e Wilson Roberto Poi,

É com imensa gratidão que lhes agradeço por serem não apenas meus orientadores no tão almejado curso de doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, mas sim pelos ensinamentos consagrados durante esse período de convivência. Ensinamentos esses, concebidos através de suas imensuráveis qualidades de intelectualidade, simplicidade, generosidade, sensatez, honestidade, eloquência e benevolência; que tomaram-me uma pessoa mais madura e compreensível. Dessa forma se internaram e eternizaram-se em mim., fazendo-me entender o que parecia ser obscuro, complexo e intrigado. Efetivamente agradeço por serem meus orientadores pelo resto da vida.

Admiro muito vocês...

Aos Meus Eternos Mestres,

Osvaldo Magro Filho, Daniela Ponzoni, Alessandra Marcondes Aranega e Ana Paula Bassi. Agradeço-lhes por de alguma forma contribuírem com a construção dos meus conhecimentos adquiridos durante minha formação e por assim dizer, me oferecem subsídios moral, social, literário e científico para a minha vida profissional.

Enfim, muito obrigada por tudo...

Aos Meus Grandes Amigos,

Rafaela Brasil Nunes, Paula Marinho, Rogério Fernando Bencini, Dênisson Pontes, Carlos Bueno e Adriano Brust (in memoriam), agradeço a vocês por serem meus melhores amigos e, durante minha vida compartilharam dos meus caminhos e desvios; alegrias e tristezas; prantos e risos; ganhos e perdas. Em especial ao meu eterno amigo Adriano Brust (Brustinho), apesar da separação abrupta e precoce, agradeço a Deus pela sua verdadeira amizade durante esse período de convivência.

Adoro muito vocês...

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita filho" - FOA/UNESP e à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas – FAO/UFAM.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho"- FOA/UNESP e Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho"- FCT/UNESP, Câmpus Presidente Prudente.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação e biblioteca da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" - FOA/UNESP.

Aos funcionários e pacientes do Hospital Santa Casa e Unimed de Araçatuba e Birigui.

Aos colegas do Curso de pós-graduação, pela convivência e ensinamentos. Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a execução e conclusão deste projeto, em especial a aluna da graduação Kátia Gonçalves.

A todos vocês só tenho a agradecer...

*“Ainda que a minha mente e o meu corpo enfraqueçam, Deus é a
minha força, Ele é tudo o que eu sempre preciso.”*
Salmos 73:26

RESUMO

Corrêa APS. Implantes de titânio com superfície tratada a base de β -tricálcio fosfato em levantamento da membrana sinusal. Estudo experimental de superfície, análise biomecânica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2018.

Modificações físicas e/ou químicas das superfícies dos implantes de titânio podem ser realizadas com intuito de facilitar e estimular o processo de osseointegração, conseqüentemente favorecendo um tempo de reparo mais curto. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as superfícies de implantes de titânio, modificadas com deposição de β -tricálcio fosfato pelo método biomimético, inseridos na maxila após levantamento de seio maxilar de coelhos, por meio da análise topográfica, biomecânica, microtomográfica, histológica e imunoistoquímica. Dezoitos (18) coelhos da raça Nova Zelândia (*Albinus*) receberam trinta e seis (36) implantes após elevação da membrana do seio maxilar bilateral. Foram divididos em dois grupos: No Grupo SBF - Implantes com superfícies modificadas pelo tratamento biomimético e preenchimento do seio maxilar esquerdo com coágulo; Grupo TCP - Implantes com superfícies modificadas com deposição de β -tricálcio fosfato pelo método biomimético e preenchimento do seio maxilar direito com coágulo. Os períodos de estudos foram de 7, 15 e 40 dias, onde foram realizadas as avaliações biomecânica, microtomográfica, histométrica e imunoistoquímica. Nas análises físico-químicas de microscopia eletrônica de varredura- MEV, espectroscopia de energia

dispersiva- EDS e mapeamento da mineralização observou-se a formação de uma camada de apatita com maiores quantidades de Ca e P nos implantes com deposição biomimética com β -tricálcio fosfato. O teste de molhabilidade mostrou superfícies de alta hidrofiliabilidade neste grupo de implantes. Na interação entre as superfícies dos implantes de Ttcp e seu ambiente biológico, a análise biomecânica demonstrou aumento da estabilidade dos implantes a partir da 2 semana. Foi observada diferença estatisticamente significativa na estabilidade (ISQ) no grupo TCP período de 15 e 40 dias ($p= 0,08$). A análise microtomográfica demonstrou que no período de 15 dias, o grupo TCP apresentou maior volume ósseo – BV ($0,16 \text{ mm}^3$), fração do volume ósseo em porcentagem - BV/TV ($24,70 \text{ mm}^3$), número - Tb.n ($2,98 \text{ mm}^3$) e espessura do trabeculado ósseo - Tb.th ($0,082 \text{ mm}^3$), quando comparado com o grupo SBF. Foi visualizado na análise histológica a formação de tecido ósseo em ambos os grupos no período de 15 e 40 dias, maior neoformação óssea foi observada no grupo com a superfície dos implantes modificada com β -tricálcio fosfato, embora a análise histométrica da ELCOI e AON não apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$). A imunoistoquímica aos 40 dias apresentou marcação moderada no grupo TCP (50%) e leve (25%) no grupo SBF, para a osteocalcina. A incorporação do β -tricálcio fosfato na superfície dos implantes de Ttcp, através da modificação do método biomimético, mostrou-se eficiente diante dos testes de avaliação da topografia dos implantes. Observou-se a influência desse tipo de superfície bioativa ao estimular a osseointegração. Sendo assim, uma opção ao tratamento das superfícies dos implantes.

Palavras-chave: Implantes dentários; Fosfato; Seio maxilar.

ABSTRACT

Corrêa APS. Titanium implants with treated surface by β -tricalcium phosphate in maxillary sinus augmentation. Experimental study of surface, biomechanical, histometric and immunohistochemistry analysis in rabbits. [tese]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2018.

Physical and/or chemical modifications of the surfaces of the titanium implants can be performed in order to facilitate and stimulate the osseointegration process, consequently favouring a shorter repair time. Thus, the objective of this study was to evaluate the surfaces of titanium implants, modified with deposition of β -tricalcium phosphate by the biomimetic method, inserted in the maxilla after lifting the maxillary sinus of rabbits, employing topographic, biomechanical, histological and immunohistochemical analysis. Eighteen (18) New Zealand rabbits (*Albinus*) received thirty-six (36) implants after bilateral maxillary sinus membrane elevation. They were divided into two groups: In the SBF Group - Implants with surfaces modified by the biomimetic treatment and filling of the left maxillary sinus with clot; Group TCP - Implants with modified surfaces with deposition of β -tricalcium phosphate by the biomimetic method and filling of the right maxillary sinus with clot. The study periods were 7, 15 and 40 days, where the biomechanical, microtomographic, histometric and immunohistochemical evaluations were performed. In the physico-chemical analyzes of scanning electron microscopy (SEM), dispersive energy spectroscopy (EDS) and mapping of mineralization, the formation of an apatite layer with higher amounts of Ca and P was observed in implants with biomimetic deposition with β -tricalcium phosphate. The wettability test showed high hydrophilicity surfaces in this group of implants. In the interaction between the surfaces of the Ttcp implants and their biological environment, the biomechanical analysis showed an increase of the stability of the implants from 2 weeks. Statistically significant difference in stability (ISQ) was observed in the TCP group at 15 and 40 days ($p = 0.08$). The microtomographic analysis showed that in the period of 15 days, the TCP group presented higher bone volume - BV (0.16 mm³), fraction of the bone volume in percentage - BV / TV (24.70 mm³), number - Tb.n (2.98 mm³) and bone trabecular thickness - Tb.th (0.082 mm³) when compared to the SBF group. Bone tissue formation in both groups was visualized in histological analysis in the 15- and 40-day periods, with a greater tendency for bone neoformation to be observed in the group with implants surface modified with β -tricalcium phosphate, although histological analysis of ELCOI and AON did not present statistical differences ($p < 0.05$). The incorporation of β -

tricalcium phosphate on the surface of the Ticp implants, through the modification of the biomimetic method, proved to be efficient in the evaluation of the topography of the implants. The influence of this type of bioactive surface on osseointegration was observed. Thus, an option to the treatment of implant surfaces.

Keywords: Dental implants, Phosphate, Maxillary sinus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Implante dentário de titânio comercialmente puro (Ticp), plataforma hexágono externo, diâmetro de 3,6mm e 6,5mm comprimento (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, linha Atrofic, Jales, SP, Brasil).	70
Figura 2-	Solução modificada de fluido corporal (Simulated Blody Fluid – SBF), que simula o fluido sanguíneo por apresentar composição iônica e pH semelhantes ao do plasma, sob agitação de 175 rpm durante 24 horas a 36,5 °C	71
Figura 3 -	Implantes imersos em Solução modificada de fluido corporal (Simulated Blody Fluid – SBF) associada ao β -tricálcio fosfato (TCP).	72
Figura 4-	Etapas do procedimento cirúrgico de instalação dos implantes dentários. (a) Exposição do dorso nasal, (b) Preparo da janela cirúrgica, elevação membrana sinusal (4c-4e) e instalação dos implantes dentários e dos parafusos de cobertura (4f-4h)	73
Figura 5 -	Imagens da MEV do terço cervical da superfície dos implantes após imersão em SBF e modificado com β -tricálcio fosfato- TCP, nas ampliações de 500x, 1.000x, 5.000x e 10.000x.	74
Figura 6-	Imagens da MEV do terço médio da superfície dos implantes após imersão em SBF e modificado com β -tricálcio fosfato- TCP, nas ampliações de 500x, 1.000x, 5.000x e 10.000x.	75
Figura 7 -	Imagens da MEV do terço apical da superfície dos implantes após imersão em SBF e modificado com β -tricálcio fosfato- TCP, nas ampliações de 500x, 1.000x, 5.000x e 10.000x.	76

Figura 8-	Espectro de energia dispersiva - EDS da superfície dos implantes após imersão em SBF e modificado com β - tricálcio fosfato- TCP, demonstrando os picos dos elementos Ca, P e Ti	77
Figura 9 -	Mapeamento dos elementos Ca (vermelho) e P (verde) nas superfícies dos implantes após imersão em SBF modificado com β - tricálcio fosfato- TCP. Observa-se camada de apatita (amarela) com maior distribuição dos íons Ca e P.	78
Figura 10 -	Mapeamento da distribuição dos elementos Ca (vermelho) e P (verde) nas superfícies dos implantes após imersão em SBF. Observa-se formação da camada de apatita (amarela).	79
Figura 11 -	Teste de Molhabilidade, em que gotículas de água foram pipetadas pelo goniômetro, com volume de queda de 3,6 μ L, sobre as porções das diferentes superfícies dos implantes	80
Figura 12 -	Teste de Molhabilidade, em que gotículas de diiodometano foram pipetadas pelo goniômetro, com volume de queda de 3,6 μ L, sobre as porções das diferentes superfícies dos implantes.	81
Figura 13 -	Teste de Molhabilidade, em que gotículas de etilenoglicol foram pipetadas pelo goniômetro, com volume de queda de 3,6 μ L, sobre as porções das diferentes superfícies dos implantes.	82
Figura 14-	Gráfico do ISQ por meio das médias em N/cm, entre os grupos SBF e TCP, nos diferentes períodos.	83
Figura 15 -	Cortes coronais das microtomografias realizadas com janela para tecidos mineralizados nos espécimes do período de 40 dias. Foi possível observar o posicionamento dos implantes no interior do seio maxilar direito (Grupo TCP) e esquerdo (Grupo SBF).	84
Figura 16 -	Microtomografias com reconstrução em 3D, onde foi possível observar a formação óssea ao redor dos implantes, no período de 15 e 40 dias, nos grupos de implantes TCP e SBF.	85
Figura 17 -	Microtomografias com reconstrução em 3D, onde foi possível observar a formação óssea ao redor dos implantes, no período de 15 e 40 dias, nos grupos de implantes TCP e SBF.	86

Figura 18 -	Gráfico do BV comparando o volume de tecido ósseo por meio das médias em mm ² , entre os grupos SBF e TCP, aos 15 e 40 dias.	87
Figura 19 -	Gráfico do BV/TV comparando a fração do volume ósseo em %, entre os grupos SBF e TCP, aos 15 e 40 dias.	87
Figura 20 -	Gráfico do Tb.sp comparando a porosidade trabeculado ósseo, em mm, entre os grupos SBF e TCP, aos 15 e 40 dias.	88
Figura 21 -	Gráfico do Tb.th comparando a espessura do trabeculado ósseo, em mm, entre os grupos SBF e TCP, aos 15 e 40 dias.	88
Figura 22 -	Gráfico do Tb. N comparando o número do trabeculado ósseo em mm, entre os grupos SBF e TCP, aos 15 dias	88
Figura 23-	Gráfico do Po.tot comparando a porosidade trabeculado ósseo, em %, entre os grupos SBF e TCP, aos 15 e 40 dias.	89
Figura 24-	Fotomicrografia da análise de imunistoquímica demonstrando a marcação para a OCN (seta vermelha), nos grupos TCP e SBF, no período de 40 dias.	90
Figura 25-	Fotomicrografia da análise de imunistoquímica demonstrando a marcação para a TRAP (seta vermelha), nos grupos TCP e SBF, no período de 40 dias.	91
Figura 26-	Fotomicrografia da análise histológica para ELCOI entre os grupos TCP (D) e SBF (E) no período de 7 dias.	92
Figura 27-	Fotomicrografia da análise histológica para ELCOI entre os grupos TCP (D) e SBF (E) no período de 15 dias.	92
Figura 28-	Fotomicrografia da análise histológica para ELCOI entre os grupos TCP (D) e SBF (E) no período de 40 dias.	93
Figura 29-	Fotomicrografia da análise histológica para AON entre os grupos TCP (D) e SBF (E) nos períodos de 15 e 40 dias.	94
Figura 30	Gráfico da ELCOI comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em μm ² das amostras aos 15 e 40 dias	95

Figura 31 Gráfico da AON comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em μm^2 das amostras aos 15 e 40 dias 95

LISTA DE LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição do plasma sanguíneo e da Solução modificada de fluido corporal (Simulated Blody Fluid-SBF) (mmol/dm^3)	97
Tabela 2-	Teste de Molhabilidade: Medida dos ângulos de contato da água, diiodometano e etilenoglicol nas superfícies dos implantes do grupo TCP	98
Tabela 3-	Teste de Molhabilidade: Medida dos ângulos de contato da água, diiodometano e etilenoglicol nas superfícies dos implantes do grupo SBF	98
Tabela 4-	Valores do quociente de estabilidade dos implantes (ISQ) por animal e grupos (N/cm) imediatamente após a instalação dos implantes.	99
Tabela 5-	Valores do quociente de estabilidade dos implantes (ISQ) por grupos no período de 7 dias (N/cm).	100
Tabela 6-	Valores do quociente de estabilidade dos implantes (ISQ) por grupos no período de 15 dias (N/cm).	100
Tabela 7-	Valores do quociente de estabilidade dos implantes (ISQ) por grupos no período de 40 dias (N/cm).	101
Tabela 8-	Teste de análise de variância com parcelas subdivididas (ANOVA), obtendo os seguintes resultados para os valores de p ($p > 0,05$) do ISQ.	101
Tabela 9-	Teste de análise de variação de Pearson (VP), obtendo os seguintes resultados para os valores de p ($p < 0,05$) do ISQ.	102
Tabela 10-	Valores da análise morfométrica da formação óssea nas microtomografias dos grupos TCP e BTC, no período de 15 dias.	104
Tabela 11-	Valores da análise morfométrica da formação óssea nas microtomografias dos grupos TCP e BTC, no período de 40 dias.	105
Tabela 12-	Teste da ANOVA referentes aos valores de BV, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):	106

Tabela 13-	Teste da ANOVA referentes aos valores de BV/TV, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):	106
Tabela 14-	Teste da ANOVA referentes aos valores de Tb.Sp, obtendo os seguintes resultados valores de p(Turkey):	107
Tabela 15-	Teste da ANOVA referentes aos valores de Tb.th, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):	108
Tabela 16-	Teste da ANOVA referentes aos valores de Tb.N, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):	108
Tabela 17-	Teste da ANOVA referentes aos valores de Po.Tot, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):	108
Tabela 18-	Análise de imunoistoquímica com os scores referentes a marcação para a osteocalcina, nos grupos TCP e SBF, no período de 40 dias.	109
Tabela 19-	Análise de imunoistoquímica com os scores referentes a marcação para a TRAP, nos grupos TCP e SBF, no período de 40 dias.	109
Tabela 20-	Teste de Kruskal-Wallis referentes aos valores da ELCOI, obtendo os seguintes resultados valores de p (Duns):	110
Tabela 21-	Teste da ANOVA referentes aos valores da AON, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):	110

LISTA DE ABREVIATURAS

Ticp=	Titânio comercialmente puro
SPT=	Spray de plasma de titânio
SPH=	Spray de plasma de hidroxiapatita
μm =	Micrometros
Al_2O_3 =	óxido de alumínio
TiO_2 =	óxido de titânio
ISQ=	<i>Implant Stability Quotient</i>
N/cm=	Unidade de medida de Newton por centímetro
HA=	Hidroxiapatita
CaP=	Fosfato de cálcio (CaP)
Ca=	Cálcio
P=	Fósforo
SBF=	<i>Simulated Body Fluid</i>
RPM=	Rotações por minuto
EDS=	Espectro de energia dispersiva
MEV=	Microscopia eletrônica de varredura
OCN=	Osteocalcina
TRAP=	Enzima Fosfatase Ácida Tartarato Resistente
ELCOI=	Extensão Linear de Contato Osso-Implante
AON=	Área de Tecido Ósseo Neoformado

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	21
II. PROPOSIÇÃO	25
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1. Materiais	28
1.1 Implantes de titânio	28
2. Tratamento Biomimético	28
2.1 Fluido corporal simulado– SBF	28
2.2 Preparação da superfície teste: modificação biomimético e β - <i>tricálcio fosfato (TCP)</i>	29
3. Caracterização Topográfica	30
3.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	30
3.2 Análise de espectroscopia por energia dispersiva (EDS)	31
3.3 Molhabilidade.....	31
4. Experimentação animal.....	32
4.1 Delineamento e Procedimento Cirúrgico	32
4.2 Procedimento Cirúrgico Experimental.....	33
4.3 Eutanásia e Coleta do Material.....	34
4.4 Processamento das peças	35
4.5 Análise Biomecânica.....	36
4.6 Análise Microtomográfica.....	36
4.7 Análise Imunoistoquímica	38
4.8 Análise Histométrica	39
4.8.1 Extensão linear de contato osso-implante	40
4.8.2 Área óssea neoformada	40
IV. RESULTADOS.....	42
1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	43
2. Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) e Mapeamento da mineralização.....	43
3. Molhabilidade.....	44
4. Análise Biomecânica	45

5. Análise Microtomográfica.....	45
6. Análise Imunoistoquímica	47
7. Análise Histométrica	48
7.1 Extensão Linear de Contato Osso-Implante:	48
7.2 Área de Tecido Ósseo Neoformado	49
V. DISCUSSÃO.....	50
VI. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS	80
Anexo A - Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais	67
Anexo B - Normas IJOMS	68
FIGURAS.....	70
TABELAS.....	98

INTRODUÇÃO

I. Introdução

O intuito de acelerar o processo de reparo dos implantes dentários ao facilitar e estimular a sua osseointegração, tem permitido o desenvolvimento de diversos estudos a respeito da morfologia e topografia da superfície destes. Pesquisas demonstram que implantes com superfícies rugosas apresentam um período de reparo mais curto do que com superfícies usinadas. O fenômeno relaciona-se a melhor retenção do coágulo, maior migração e proliferação celular e aumento da área de contato dos implantes.^{1,2}

A superfície do titânio comercialmente puro (TiCP), ao longo do avanço tecnológico da implantodontia, vem passando por diversos métodos de modificação. Desde superfícies usinadas,³ macrotextrizadas por adição de partículas de titânio (Spray de plasma de titânio - SPT) ou fosfato de cálcio (Spray de plasma de hidroxiapatita – SPH)³⁻⁶ ou por subtração, empregando o jateamento com partículas de silício, óxido de alumínio (Al₂O₃), óxido de titânio (TiO₂) e vidro, microtexturização por subtração com ataque ácido a associação da macrotextrização de jateamento com posterior microtexturização com ataque por ácido sulfúrico ou hidrocloreídrico.^{4,7}

Modificação das superfícies dos implantes por LASER remota ao final dos anos noventa⁸ e desde então, estudos demonstram uma microestrutura de superfície com aumento da área de contato, alto grau de pureza e dureza, resistência a corrosão e biocompatibilidade com este método.^{9,13}

Em associação aos benefícios observados em estudos com o tratamento da superfície dos implantes com LASER,^{9-13,14} a engenharia tecidual tem se desenvolvido como alternativa para a obtenção de biomateriais que mimetizam o arcabouço ósseo autógeno, a respeito de sua porosidade, tamanho das

partículas, pureza e solubilidade; o que traduz na capacidade de osteocondução, bem como favorece o processo de neoformação óssea. Sendo assim, a superfície dos implantes comercialmente puros (Ticp) passaram a ser modificadas por LASER associadas com a deposição de biomateriais.^{15,16}

Atualmente, as pesquisas a respeito das superfícies dos implantes são focadas no desenvolvimento de novos biomateriais para revestimento, visando minimizar as falhas e melhorar o processo de osseointegração e, aumentar a durabilidade dos implantes. Comumente, estudos concentram-se no revestimento com biomaterial sintético de hidroxiapatita (HA),¹⁵⁻²¹ vidro bioativo^{21,22} ou fosfato de cálcio (CaP).²³ Esse biomateriais favorecem a interação entre tecido ósseo e implante através da formação de uma camada de apatita biologicamente ativa semelhante ao tecido ósseo. Os métodos de tratamento da superfície dos implantes com biomateriais demonstram as vantagens da associação da excelente biocompatibilidade do titânio com as propriedades químicas de osteocondutividade destes.

Diversas pesquisas comparam os efeitos promovidos à osseointegração pelas superfícies revestidas com hidroxiapatita (HA) e fosfato de cálcio (CaP). Observou-se que as superfícies modificadas por fosfato de cálcio (CaP) promovem adsorção das proteínas do fluido corporal para a superfície e, portanto, influenciam na migração e proliferação celular e depósito de cálcio ao estabelecer uma matriz tridimensional, através da qual as células osteogênicas migram para alcançar a superfície do implante.^{22,23}

Nas últimas décadas, diversos métodos de modificação química das superfícies para a incorporação de íons de cálcio (Ca) e fósforo (P) vem sendo alvos de estudos, a citar o método tradicional de pulverização de íons e de

plasma, eletrólise e o recente e versátil método biomimético. Embora a integração da hidroxiapatita (HA) pelo método de spray de plasma – SPH acelere a osseointegração correlacionada aos implantes sem revestimento, estudos demonstram limitações deste método, ao promover uma estrutura cristalográfica de revestimento mecanicamente e quimicamente instável entre o óxido de titânio (TiO) e o revestimento de apatita (HA), podendo ser reabsorvido após longos períodos de função e, assim traduzir-se em falhas na osseointegração.²⁴⁻²⁶

Outra técnica de tratamento vem sendo atualmente utilizada com a vantagem da possibilidade do controle da espessura da camada depositada sobre a superfícies do implante, assim promove uma topografia superficial mecânica e química mais estável de ligação ao metal e, como consequência promove a osseointegração em um período mais curto. Esse método biomimético baseia-se na utilização de uma solução chamada de Fluido Corporal Sintético (SBF), que apresenta composição química, temperatura e pH semelhante ao plasma sanguíneo.^{16,27}

É indiscutível e indubitável que o sucesso na implantodontia não apenas relaciona-se com a técnica operatória, mas também quanto aos avanços tecnológicos da topografia das superfícies dos implantes dentários no intuito de beneficiar o processo de osseointegração. Ao revestir as superfícies dos implantes com uma camada de fosfato de cálcio (CaP), grandes melhorias foram alcançadas na osteocondutividade. Recentemente foram realizadas tentativas de deposição de camadas de fosfato de cálcio em condições mais fisiológicas ou “biomiméticas” em relação aos demais métodos. Com o tratamento biomimético é possível a incorporação de um promotor osteogênico à superfície do implante metálico.^{16,27-29} Portanto, os revestimentos biomimético de fosfato de cálcio são

considerados um veículo promissor para promotores osteogênicos, de fácil preparação e que permite uma liberação local, lenta e controlada com influência direta no processo de osseointegração³⁰

PROPOSIÇÃO

II. Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio das análises de biomecânica, microtomográfica, histométrica e imunoistoquímica, a influência na osseointegração, de implantes de titânio comercialmente puros (Ticp) com superfícies modificadas à base de β -tricálcio fosfato (TCP) pelo método biomimético, após levantamento do seio maxilar em coelhos.

Avaliar a topografia da superfície dos implantes submetidos a incorporação do β -tricálcio fosfato (TCP) pelo método biomimético, por meio das análises de microscopia eletrônica de varredura- MEV, energia dispersiva- EDS, mapeamento da mineralização e teste de Molhabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

III. Material e Métodos

1. Materiais

1.1 Implantes de titânio

Foram utilizados nesse estudo 36 (trinta e seis) implantes dentários de titânio comercialmente puro (Ticp) submetidos ao ataque ácido, plataforma hexágonos externo, medindo 3,6mm de diâmetro e 6,5mm de comprimento (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, linha Atrofic, Jales, São Paulo, Brasil) (Figura 1), com dois tipos de tratamento de superfícies. Uma superfície foi submetida ao tratamento biomimético e, a superfície teste foi modificada com biomaterial. Seguem abaixo os grupos:

1. Grupo SBF: Implante comercialmente puro de titânio (Ticp) com superfície modificada pelo tratamento biomimético.
2. Grupo TCP: Implante comercialmente puro de titânio (Ticp) com superfície modificada pelo tratamento biomimético associado a deposição de β -tricálcio fosfato (TCP).

2. Tratamento Biomimético

2.1 Fluido corporal simulado - SBF

Para a elaboração do SBF colocou-se 500ml de água destilada em um béquer com capacidade para 1000ml 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: 12,0045g de NaCl, 0,5025g de NaHCO₃, 0,3360g de KCl, 0,2610g de K₂HPO₄, 0,1065g de Na₂SO₄, 60ml de HCl 1 molar, 0,5520g de CaCl₂.2H₂O e 0,4575g de MgCl₂.H₂O (Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Steinheim, Alemanha) (Tabela 1) 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 pH neutro 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 1000ml de SBF utilizado.

2.2 Preparação das superfícies de teste: modificação pelo método biomimético e β -tricálcio fosfato (TCP)

Os implantes Ticp submetidos ao tratamento biomimético foram imersos em 30ml de solução modificada de fluido corporal (Simulated Blody Fluid – SBF)^{17,31}, que simula o fluido sanguíneo por apresentar composição iônica e pH semelhantes ao do plasma, por 7 dias e submetidos à agitação de 175rpm durante 24 horas a 36,5°C (Figura 2). Em seguida, foram lavados com água

destilada, secos por um período de 24 horas a 50°C e, posteriormente, esterilizados com raios gama para utilização.

Os implantes Ticp submetidos ao tratamento biomimético associado a deposição de β -tricálcio fosfato foram imersos em 30ml de solução modificada de fluido corporal (Simulated Blody Fluid - SBF),^{31,32} sob agitação de 175 rpm durante 24 horas a 36,5°C. Quatro gramas de β -tricálcio fosfato foram diluídos em 1000 ml de SBF, mantendo a concentração em 4000 μ g/ml, distribuídos isoladamente em 30 ml dessa solução. As amostras ficaram imersas por 7 dias na solução, a 37°C, sem agitação (Figura 3). Em seguida, foram lavados com água destilada, secos por um período de 24 horas a 50°C e esterilizados com raios gama para utilização.

Os parafusos de cobertura foram inseridos nos implantes dos respectivos grupos 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.

3. Caracterização Topográfica de superfície

3.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Antes da realização do procedimento cirúrgico de elevação da membrana sinusal e instalação dos implantes nos coelhos, a topografia das superfícies de três implantes de cada grupo, foi analisada pela Microscopia Eletrônica de Varredura. As análises qualitativas se deram nas regiões apical, terço médio e

cervical dos implantes, 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) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”- FCT/UNESP, Câmpus Presidente Prudente, operando com feixe de elétrons de 20kV nas magnificações de 500x, 1000x, 5000x e 10000x

3.2 Análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e Mapeamento da mineralização

Os mesmos implantes submetidos à 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 da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”- FCT/UNESP, Câmpus Presidente Prudente. Realizou-se análise da variação química e quantificação em pontos padronizados, principalmente, dos elementos cálcio, fósforo e titânio.

Com base nas imagens adquiridas durante a microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi realizado o mapeamento dos elementos Ca, P e Ti sobre a superfície dos implantes. Software específico de mapeamento por cores demonstrou os diferentes graus de distribuição dos elementos para análise qualitativa.

3.3 Molhabilidade

Com o emprego de um goniômetro (DSA 100 - Krüss GmbH. Hamburgo, Alemanha) da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”- FOA/UNESP foram realizadas mensurações dentre os dois grupos de superfícies de implantes, nas porções cervical, média e apical. Foram mensurados o ângulo de contato com a água 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.

4. Experimentação animal

4.1 Delineamento e Procedimento Cirúrgico

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-UNESP e aprovado segundo o processo nº FOA- 2015-00360 (Anexo A).

Utilizou-se 18 (dezoito) coelhos da raça Nova Zelândia, variação “*albinus*”, machos, adultos, com idade aproximada de 5 (cinco) meses e peso corporal entre 3 a 4Kg, receberam um total de 36 (trinta e seis) implantes.

Foram examinados dois grupos de superfície de implantes. Assim, foi realizado o procedimento de levantamento da membrana do seio maxilar bilateral

dos dezoito animais e instalação imediata de um implante com as diferentes superfícies tratadas em cada seio. A distribuição dos implantes nos animais configurou-se na instalação de um implante comercialmente puro de titânio (Ticp) com superfície modificada pelo tratamento biomimético associado a deposição de β -tricálcio fosfato (TCP) no seio maxilar lado direito (Grupo TCP) e um implante comercialmente puro de titânio (Ticp) com superfície modificada pelo tratamento biomimético no seio maxilar lado esquerdo (Grupo SBF), distribuídos em três períodos de análise após sacrifício (7, 15 e 40 dias).

Os animais foram obtidos do Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, sendo alimentados com ração sólida padrão (Ração Procoelho, Primor®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) e água “*ad Libitum*” durante todo o experimento, no Núcleo de Experimentação em Coelhos- NECO da FOA/UNESP.

4.2 Procedimento Cirúrgico Experimental e Cuidados Pós-operatórios

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 8 horas e sedados pela administração via intramuscular de Cloridrato de Cetamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 10mg/Kg, e de Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Foi realizada em complementação anestésica a 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 0,3ml/Kg na linha mediana do dorso nasal.

A região nasal foi acessada após prévia tricotomia e antissepsia pré-operatória no dorso nasal por fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrolidona Iodo Degerrmante a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto). O protocolo cirúrgico utilizado para o acesso a cavidade sinusal do animal foi o estabelecido por Asai *et al.*, 2002.³³ 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 5cm foi realizada 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 a da sutura nasoincisaal (Figura 4a). Após exposição, confeccionou-se uma janela circular de 3mm de diâmetro bilateralmente a linha mediana do dorso nasal, aproximadamente a 2cm anterior a sutura nasofrontal e a 1cm lateralmente a linha média. Este procedimento foi realizado sobre abundante irrigação com solução salina fisiológica estéril a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), com a utilização de uma broca trefina de 3mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) para a demarcação da área, e broca diamantada esférica nº1011 (KG Sorensen®, Cotia, São Paulo, Brasil) para a finalização das osteotomias. Ambas montadas em contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinvile, Brasil) conectado a um motor elétrico de rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1200rpm (Figuras 4b,c,d,e). A membrana sinusal foi cuidadosamente descolada e elevada com curetas especiais (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) para garantir que sua integridade física fosse mantida. Finalizado o procedimento de levantamento do seio maxilar e instalação dos implantes, o retalho total foi

reposicionado e sutura realizada com fio Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples (Figuras 4e,f,g,h).

No pós-operatório imediato, os animais receberam uma dose única intramuscular de Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil) na dosagem de 0,1ml/Kg e de Dipirona Sódica (Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil) na dosagem de 1mg/Kg/dia. As medicações antibiótica e analgésica foram mantidas por um período de 2 dias consecutivos. Os animais foram mantidos no Núcleo de Experimentação em Coelhos- NECO da FOA/UNESP, nas mesmas circunstâncias que se encontravam previamente ao procedimento cirúrgico, até a eutanásia animal, que se deu com 7,15 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,

15 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 Biomecânica

O teste biomecânico foi realizado imediatamente após a instalação dos implantes e nos períodos de 7, 15 e 40 dias de pós-operatório. Os complexos nasomaxilares de cada grupo e seus períodos correspondentes foram reabertos para expor os implantes e verificação da estabilidade por meio da análise da frequência de ressonância, com a utilização do Osstell (Osstell® ISQ, SmartPeg Osttel® Type 21, Gothenburg, Suécia). Os valores do quociente de estabilidade dos implantes (ISQ) foram agrupados e submetidos a análise estatística de variância com parcelas subdividas (ANOVA) para comparação entre os diferentes grupos e períodos, adotando um nível de significância de 5%.

4.6 Análise Microtomográfica

Após eutanásia, o complexo nasomaxilar foi removido em bloco e todo o tecido mole superficialmente eliminado. Duas amostras de cada período estudado (7, 15 e 40 dias) foram escaneadas (SkyScan - Kontich, Bélgica) com fatias de 8,74 µm de espessura a uma energia de raio-X de 50 kV e 500 µA de corrente em meio seco. As imagens foram capturadas com uma câmera de 12,45 µm pixel, com uma contagem de 2.672 linhas e 4.000 colunas. O passo de rotação foi de 0,5 com rotação de 180° e *frame* igual a 3. O filtro utilizado foi de alumínio (0,5 mm) e a duração média de varredura foi de 41 minutos. Após essas etapas, as imagens foram reconstruídas usando o software NRecon (v1.6.9.8) (SkyScan - Kontich, Bélgica) com alisamento de 1, correção de artefatos de anel de 3, correção de endurecimento de grão de 5% e variação de correção de imagem de

0,0 a 0,11. As imagens tridimensionais e as imagens reconstruídas foram analisadas usando o software CTAnalyzer (CTAn) (v1.12.4.0) (SkyScan - Kontich, Bélgica). As imagens foram abertas, posicionadas axialmente e, sessenta fatias da região correspondente as espiras dos implantes foram selecionadas usando a ferramenta ROI. A área escolhida incluiu tecido ósseo em toda a extensão. Usando a ferramenta de visualização de seleção binária, o histograma foi padronizado em 255% e com um índice de 60. Em seguida, foi utilizada a ferramenta de visualização de morfometria para analisar os dados tridimensionais (3D) do osso trabecular, definindo o volume ósseo segmentar da área de interesse (BV), a fração do volume ósseo (BV/TV), a espessura trabecular (Tb.Th), o número trabecular (Tb.N), porosidade óssea (Po.tot) e a separação trabecular (Tb.Sp) como preconizado por Buxsein *et al.*, 2010.³⁴

A análise estatística foi conduzida por meio da comparação intra grupos e entre os grupos SBF e TCP. As amostras foram submetidas à curva de normalidade, resultando em dados paramétricos. O teste estatístico empregado foi ANOVA e como pós-teste para os valores que mostraram significância estatística foi empregado o método de Turkey. Os testes foram conduzidos através de software Biostat 5.3 utilizado para análise estatística em estudos na área de saúde.

4.7 Análise Imunoistoquímica

O processamento imunoistoquímico foi realizado no Laboratório para estudo de tecidos mineralizados (LSMT) do Departamento de Ciências Básicas da FOA/UNESP.

Foi utilizado o método de detecção por imunoperoxidase e os cortes em parafina foram selecionados para a realização da imunomarcação contra as proteínas osteocalcina (SC18319) e TRAP (SC30832), com o intuito de avaliar, respectivamente as etapas de mineralização do tecido ósseo e a atividade de reabsorção óssea.

O processamento imunistoquímico iniciou-se pelas etapas de desparafinização (manutenção dos cortes em estufa durante 20 minutos, seguidos banhos em citrisolv e banhos em concentrações decrescentes de álcoois) e finalizando com a hidratação dos cortes imersos em PBS (solução de tampão fosfato salina 0,01M). A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio e, na etapa seguinte, as lâminas passaram pela recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) em calor úmido. Foi realizado ainda o bloqueio da biotina endógena com leite desnatado por 20 minutos. Ainda como método de bloqueio de marcações inespecíficas, o anticorpo primário foi preparado em solução de tampão fosfato e albumina bovina a 1%.

Os anticorpos primários utilizados foram contra OCN (SC18319) e TRAP (SC 30832), anticorpos policlonais, produzidos em cabra (Santa Cruz Biotechnology). O anticorpo secundário utilizado foi o anticorpo biotilado anti-cabra, produzido em burros (Jackson Immunoresearch Laboratories). O sinal da reação foi amplificado através da incubação em avidina e biotina (Kit ABC standard, Vector Laboratories) e a reação foi revelada utilizando a Diaminobenzidina (Dako laboratories). Ao término das reações imunistoquímicas, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Na sequência, as lâminas passaram pelas etapas de desidratação, embebidas

em xilol, as lamínulas foram montadas para posterior análise em microscópio óptico (Nikon, Eclipse 80i, Shinagawa, Tokyo, Japão), objetiva de 25x.

Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas por análise qualitativa ordinal através da atribuição de diferentes escores de acordo com a quantidade de células e área de matriz extracelular imunomarcadas durante o processo de osseointegração. Os resultados foram apresentados na forma de tabelas mostrando o escore representativo dos grupos e períodos experimentais analisados (Querioz TP *et al.*, 2009).³⁵ O analisador foi submetido ao teste Kappa onde o índice acima de 0,8 foi obtido, mostrando que os escores observados foram consistentes. Os escores utilizados representam 0 (ausência de marcação), 1 (marcação leve, onde até 25% da área analisada apresentou marcação positiva para a proteína estudada), 2 (marcação moderada, onde até 50% da área analisada apresentou marcação positiva para a proteína analisada) e 3 (marcação intensa, onde até 75% da área analisada apresentou marcação positiva para a proteína analisada).

4.8 Análise Histométrica

4.8.1 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 magnificação 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 μm e se diferenciaram por medidas de tecido ósseo e medidas de tecido mole.

A análise estatística foi conduzida por meio da comparação intra grupos e entre os grupos SBF e TCP. As amostras foram submetidas à curva de normalidade, resultando em dados não paramétricos. O teste estatístico empregado foi Kruskal-Wallis e como pós-teste para os valores que mostraram significância estatística foi empregado o método de Dunn. Os testes foram conduzidos através de software Biostat 5.3 utilizado para análise estatística em estudos na área de saúde.

4.8.2 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 μm^2 , 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.

A análise estatística foi conduzida por meio da comparação intra grupos e entre os grupos SBF e TCP. As amostras foram submetidas à curva de normalidade, resultando em dados paramétricos. O teste estatístico empregado foi ANOVA e como pós-teste para os valores que mostraram significância estatística foi empregado o método de Turkey. Os testes foram conduzidos através de software Biostat 5.3 utilizado para análise estatística em estudos na área de saúde.

RESULTADO

IV. Resultados

1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Dadas as ampliações de 500x, 1000x, 5000x e 10000x para os implantes submetidos ao tratamento biomimético- SBF e com superfície modificada com β -tricálcio fosfato- TCP, observou-se diferença na comparação das imagens representativas de ambos os grupos. Uma imagem referente a região do terço cervical, médio e apical do implante foi selecionada aleatoriamente para comparação.

As figuras 5, 6 e 7 mostram a presença de pequenas partículas na superfície dos implantes no terço cervical, médio e apical dos grupos SBF e TCP, após o tratamento biomimético e biomimético com a incorporação de β -tricálcio

fosfato, respectivamente. A solução SBF e modifica com β -tricálcio fosfato- TCP causou a formação de um revestimento de apatita, com grãos esféricos pequenos com morfologia em forma de flor, visualizadas nas ampliações de 500x, 1000x, 5000x e 10000x (Figura 5). O grupo TCP apresentou maior adesão de partículas com a superfície menos nítida nas maiores ampliações de 5000x e 10000x, tanto na porção média e apical dos implantes (Figuras 6 e 7).

2. Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) e Mapeamento da mineralização

Corroborando com os resultados observados na análise de Microscopia eletrônica de varredura (MEV), o Espectro de energia dispersiva (EDS) indica a presença dos elementos cálcio e fósforo nos grupos SBF e TCP, demonstrando a formação de revestimento de apatita sobre a superfície dos implantes em ambos os grupos. No entanto, no grupo TCP, os implantes apresentaram 6,31% e 7,43% de peso de íons de fósforo; 7,07% e 8,39% de cálcio, enquanto o grupo SBF demonstrou 3,90% e 3,97% peso de fósforo e 4,06% e 4,17% de cálcio, em suas superfícies (Figura 8). Dessa forma, observa-se a formação de uma camada de apatita com pesos maiores significativos de Ca e P nos implantes com superfície tratadas pelo método biomimético modificado com β -tricálcio fosfato.

Com base nas imagens adquiridas durante a análise de MEV e nos resultados do EDS, o mapeamento demonstrou a formação da camada de apatita em ambos os grupos (Figura 9 e 10). No grupo TCP foi possível observar extensa camada de apatita com maior distribuição dos íons de cálcio e fosfato sobre a superfície dos implantes (Figura 9).

3. Molhabilidade

O grupo de implantes com a superfície tratada pelo método biomimético-SBF apresentou ângulo de contato com a água em média de 125° e 123,7° para o etilenoglicol, enquanto no grupo TCP não foi possível a mensuração do ângulo de contato com a água e etilenoglicol, pelo software, em virtude do rápido escoamento sobre as diferentes porções dos implantes, determinando uma superfície altamente hidrofílica (Tabelas 2 e 3; Figuras 11-13).

4. Análise Biomecânica

Imediatamente à instalação dos implantes e nos períodos de 7, 15 e 40 dias de pós-operatório foi realizada a verificação da estabilidade dos implantes por meio da análise da frequência de ressonância, com a utilização do Osstell® (Osstell ISQ, Gothenburg, Suécia). Os valores do quociente de estabilidade dos implantes (ISQ) foram agrupados (Tabelas 4-7). Foi possível observar no período inicial imediatamente a instalação dos implantes que a média dos valores do ISQ corresponderam respectivamente 12,8 N/cm e 13,00 N/cm para os grupos SBF e TCP, demonstrando-se assim a padronização quanto a execução técnica de instalação dos implantes. Após o período de 15 dias detectou-se a diminuição da estabilidade dos implantes e um aumento gradativo a partir deste (SBF= 11,17 N/cm e TCP= 15,50 N/cm). No período de 40 dias foi possível visualizar aumento na estabilidade dos implantes quando comparado ao período inicial e 15 dias em

ambos os grupos, demonstrando a osseointegração dos implantes (SBF= 14,33 N/cm e TCP= 19,33 N/cm) (Figura 14).

Na comparação do ISQ entre os grupos SBF e TCP no mesmo período inicial, 7, 15 e 40 dias não foi observada diferença estatisticamente significativa respectivamente ($p= 0,818$; $p= 0,143$; $p=0,295$ e $p=0,231$) (Tabela 8; Figura 14).

Na comparação intra grupos nos diferentes períodos, foi observado diferença estatisticamente significativa do ISQ no grupo SBF no período inicial e após 7 dias ($p= 0,011$), assim como, no grupo TCP período de 15 e 40 dias ($p= 0,008$). Entre os grupos, nos diferentes períodos de tempos, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo TCP período de 7 dias e SBF período inicial ($p=0,023$) (Tabela 9; Figura 14).

5. Análise Microtomográfica

Os espécimes foram microfotografados com o objetivo inicial de uma análise qualitativa geral dos implantes e do seio maxilar, foi possível confirmar a localização dos implantes no interior da cavidade sinusal, em diferentes direções anteroposteriores (Figuras 15 e 16).

As imagens das microtomografias com reconstrução em 3D e análise morfométrica do trabeculado ósseo demonstrou que nos períodos de 15 e 40 dias foi possível observar formação óssea ao redor dos implantes nos grupos SBF e TCP (Figura 17). Os dados referente ao volume ósseo segmentar da área de interesse (BV), fração do volume ósseo (BV/TV), a espessura trabecular (Tb.Th), o número de trabéculas (Tb.N), a separação trabecular (Tb.Sp) e a porosidade

óssea total (Po.tot) foram agrupados e tabulados (Tabelas 10 e 11; Figuras 18-23).

Observou-se que no período de 15 dias, o grupo TCP apresentou maior volume ósseo – BV ($0,16 \text{ mm}^3$), fração do volume ósseo em porcentagem - BV/TV ($24,70 \text{ mm}^3$), número - Tb.n ($2,98 \text{ mm}^3$) e espessura do trabeculado ósseo - Tb.th ($0,082 \text{ mm}^3$), quando comparado com o grupo SBF. No período de 40 dias o volume de formação óssea foi bastante similar entre os grupos, tais valores descritos acima para o período de 15 dias apresentaram-se bastantes análogos após 40 dias. No grupo TCP, nesse mesmo período, notou-se uma maior porosidade óssea em relação ao SBF (Tabelas 10 e 11; Figuras 18-23). Na comparação do volume ósseo (BV) e fração do volume ósseo (BV/TV) entre os grupos SBF e TCP aos 15 dias não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,2042$; $p=0,3254$). No período de 40 dias os valores de BV e BV/TV para SBF e TCP também não se mostraram significante estatisticamente ($p = 0,8767$; $p=0,7267$). Na comparação dentro do mesmo grupo em períodos diferentes, os valores de BV e BV/TV apresentaram diferenças estatísticas em ambos os grupos (SBF $p = 0,0003$, $p=0006$; TCP $p= 0,009$; $p=0,0179$). Diferenças estatística foram observadas entre os grupos nos diferentes períodos ($p = 0,0007$, $p= 0,0036$; $p = 0,0019$, $p= 0,0046$) (Tabelas 12 e 13; Figuras 18 e 19). Quanto a separação das trabéculas ósseas (Tb.sp) não foi observada diferença estatística (Tabela 14 Figura 20). Entretanto, em relação a espessura das trabéculas ósseas (Tb.th), observou-se diferença estatisticamente significativa entre SBF 15 dias e TCP 40 dias ($p=0,0250$) (Tabela 15, Figura 21).

Na comparação do número de trabéculas ósseas (Tb.n) e porosidade (Po.Tot) entre os grupos SBF e TCP aos 15 dias não foi observada diferença

estatisticamente significativa ($p = 0,581$; $p=0,3254$). No período de 40 dias os valores de Tb.n e Po.tot para SBF e TCP também não se mostraram significante estatisticamente ($p = 0,1689$; $p=0,7267$). Na comparação dentro do mesmo grupo em períodos diferentes, os valores de Tb.n e Po.tot apresentaram diferenças estatísticas apenas no grupo SBF ($p = 0,0007$, $p=00060$). Contudo, no grupo TCP, observou-se diferença estatística em relação a porosidade óssea, aos 40 dias ($p=0,0179$). Diferenças estatística foram observadas entre os grupos nos diferentes períodos ($p = 0,0112$, $p= 0,019$; $p = 0,0031$, $p= 0,0046$) (Tabelas 16 e 17; Figuras 22 e 23).

6. *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 40 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 formação de tecido ósseo, a osteocalcina estava presente tanto em precipitação sobre a matriz, como também nas células osteoblásticas ao redor do tecido ósseo. Marcação

moderada (50%) e leve (25%) foi notada no grupo TCP e SBF respectivamente (Tabela 18; Figura 24).

A TRAP esteve marcada positivamente em osteoclastos, sendo, portanto, um marcador da reabsorção do tecido ósseo. Aos 40 dias observou-se leve (25%) marcação positiva para TRAP, evidenciando discreta atividade osteoclástica nas regiões avaliadas nos grupos SBF e TCP (Tabela 19; Figura 25).

7. Análise Histométrica

7.1. Extensão Linear de Contato Osso-Implante

No período de 07 dias em ambos os grupos experimentais foi possível observar a formação de tecido conjuntivo fibroso ao longo da extensão linear da superfície dos implantes. Notou-se em meio ao tecido conjuntivo indícios de formação óssea ao redor dos implantes. Em relação a área correspondente ao tecido conjuntivo fibroso e início de formação ósseas apresentaram-se bastantes similares entre os grupos estudados. (Figura 26).

Aos 15 e 40 dias, tecido ósseo pode ser observado ao redor dos implantes, com aumento gradual nos dois grupos estudados. Em ambos os grupos, o tecido ósseo neoformado parece ter sido originado da matriz óssea nasal. Uma maior tendência a neoformação óssea foi observada no grupo com a superfície dos implantes modificada com β -tricálcio fosfato (Figuras 27 e 28).

A análise qualitativa do tecido ósseo em torno de SBF e TCP implantes no período de 40 dias revelou um amadurecimento tecido ósseo cortical devido ao mais regular e homogêneo deposição de fibras de colágeno, com a formação de fibras concêntricas

lamelas e pequena áreas de tecido conjuntivo imaturo. No grupo TCP maior maturação tecidual e manutenção da interface de contato entre as superfícies e tecido ósseo foi verificado. Considerando que nos implantes SBF, no período de 40 dias, houve menor quantidade de trabéculas ósseas entre as espirais dos implantes na região cortical, e estes foram entrelaçados com tecido conjuntivo imaturo.

Na comparação da ELCOI entre os grupos SBF e TCP aos 15 dias não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,9999$). No período de 40 dias os valores de ELCOI para SBF e TCP também não se mostraram significante estatisticamente ($p = 0,9999$) (Tabela 20; Figuras 26-28). Na comparação dentro do mesmo grupo em períodos diferentes, os valores de ELCOI não apresentaram diferenças estatísticas em ambos os grupos (SBF $p = 0,9999$; TCP $p = 0,8197$). Diferença estatística não foi observada entre os grupos nos diferentes períodos ($p = 0,9999$; TCP $p = 0,3179$) (Tabela 20; Figuras 26-28).

7.2. Área de Tecido Ósseo Neoformado

Na comparação da AON entre os grupos SBF e TCP aos 15 dias não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,8995$). No período de 40 dias os valores de AON para SBF e TCP também não se mostraram significante estatisticamente ($p = 0,9871$) (Tabela 21, Figura 29-31). Na comparação dentro do mesmo grupo em períodos diferentes, os valores de AON não apresentaram diferenças estatísticas em ambos os grupos (SBF $p = 0,5948$; TCP $p = 0,7975$). Diferença estatística não foi observada entre os

grupos nos diferentes períodos ($p = 0,9344$; TCP $p = 0,4128$) (Tabela 21; Figura 30 e 31).

DISCUSSÃO

V. Discussão

Atualmente, a imposição da necessidade da estética dental e harmonização facial vem determinando a imprescindibilidade do restabelecimento da função dental com implantes dentários mais rapidamente, conduzindo o implantodontista ao planejamento e realização de protocolos de carga imediata e precoce. A principal causa de insucessos dos implantes dentários é a falta de estabilidade primária.³⁶ A execução de uma técnica cirúrgica satisfatória seguindo os princípios cirúrgicos e a topografia das superfícies dos implantes são fatores que determinam a obtenção dessa estabilidade primária, diante disto diversos estudos vem sendo realizados quanto as modificações relativas a superfície dos implantes.

A análise da estabilidade dos implantes por frequência de ressonância (FR) desenvolvida por Meredith *et al.*, 1996 é um método confiável e com aplicabilidade clínica, amplamente utilizado para fins clínicos ou experimentais.³⁷ Nos últimos anos, alguns estudos demonstram e comprovam a aplicabilidade deste método. Em uma extensa revisão da literatura, na qual 49 artigos sobre a análise de FR para mensuração da estabilidade dos implantes, demonstraram a viabilidade e a previsibilidade da técnica. Porém, a maioria desses, são estudos retrospectivos ou não controlados ou randomizados, longitudinais e prospectivos de curto prazo. No entanto, foi possível observar que a FR demonstra altos índices do quociente de estabilidade (ISQ) diante da osseointegração e baixos índices em casos malsucedidos.³⁸

Estudo com objetivo de comprovar a utilização do método da frequência de ressonância (FR) para avaliar a estabilidade dos implantes, durante diferentes

períodos de cicatrização, demonstrou diminuição gradativa nos valores do ISQ após 2 semanas e aumento gradual no período de 4 e 12 semanas.^{39,40} Resultados semelhantes foram obtidos neste estudo em ambos os grupos, com diminuição do ISQ na primeira semana e aumento após 15 e 40 dias. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.⁴⁰ Contudo, o presente estudo apresentou diferença estatística no grupo TCP período de 15 e 40 dias ($p=0,08$).

Nos últimos vinte anos, os estudos em implantodontia apresentam como enfoque as modificações físicas e químicas da superfície dos implantes, com o intuito de melhorar o processo de osseointegração, principalmente em situações clínicas limitantes de osso com baixa qualidade. As modificações químicas de revestimento de apatita dos implantes, a partir do método biomimético tem demonstrado níveis elevados de Ca e P, criando uma superfície bioativa.^{27,29,41-43} A utilização da solução padrão de fluido corporal- SBF nem sempre demonstra a constituição da camada de apatita.²⁹ Contudo, no presente estudo, nas análises topográficas de MEV, EDS e mapeamento foi possível observar a composição da camada de apatita tanto com o método biomimético padrão e modificação deste pela deposição de β - tricálcio fosfato. No grupo TCP constatou-se elevados picos de Ca e P em comparação a superfície biomimética- SBF, corroborando com a literatura que demonstra camadas de apatita com acentuados íons de Ca e P, através da modificação do método biomimético padrão.^{27,29,44}

O processo de tratamento biomimético de implantes com superfície submetida a subtração ácida determina, inicialmente, a formação de uma camada quimicamente estável de TiO_2 , após imersão em solução alcalina há dissolução da camada de óxido e formação de titanato de sódio ($Na_2 TiO_3$).^{16,27-29,41} Quando

os implantes são finalmente imersos em SBF a 37°C, os íons Na^+ são substituídos por íons H_3O^+ do SBF formando grupos TiOH na superfície, atraindo íons Ca^{2+} , tornando a superfície levemente positiva, atraindo íons fosfato (PO_4^{2-}) para formar fosfato de cálcio amorfo ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). A camada de apatita resultante é fortemente ligada ao substrato já que se integra ao titânio a partir do óxido de titânio.^{16,27} Estudos com o revestimento da superfície dos implantes com CaP nem sempre demonstram o efeito benéfico sobre a osseointegração,⁴¹⁻⁴³ entretanto no presente estudo foi possível observar o efeito da formação da camada de apatita nas superfícies dos implantes ao estimular o processo de osseointegração em ambos os grupos SBF e TCP nos períodos de 15 e 40 dias. A deposição biomimética como β -tricálcio fosfato, no período de 15 e 40 dias, histologicamente demonstrou maior formação óssea neste grupo, considerando que nos implantes SBF, no período de 40 dias, houve menor quantidade de trabéculas ósseas e estes foram entrelaçados com tecido conjuntivo mais imaturo.

O presente estudo mostra que a deposição biomimética de β - tricálcio fosfato na superfície de implantes de Ttcp influenciou diretamente o processo de osseointegração. Embora, não se tenha obtido diferença estatística na ELCOI e AON ($p < 0,05$), como observados em outros estudos que ratificam a influência do biomaterial CaP na oteogenicidade^{45,46}, a análise de imunistoquímica, aos 40 dias, visualizou-se marcação moderada (50%) para osteocalcina, em comparação ao SBF (25%), assim como em demais estudos presentes na literatura atual.^{27,45,46}

De um modo geral o aumento da rugosidade da superfície dos implantes aumenta a molhabilidade da superfície, afetando absorção das proteínas, estabilidade inicial do coágulo e aderência e locomoção das células.²⁹⁻⁴⁴ Os

resultados aqui demonstrados validam outros, que sustentam que a hidrofília da superfície dos implantes é importante durante o condicionamento inicial das proteínas e adesão celular. Maiores ângulos de contato com a água foram observados no grupo β -tricálcio fosfato, corroborando com resultados presentes na literatura.^{29,44,45}

Ainda foi possível constatar nas microtomografias maior formação óssea no período de 15 dias no grupo TCP, apresentando maior volume ósseo, fração do volume ósseo em porcentagem, número e espessura do trabeculado ósseo, quando comparado com o grupo SBF, legitimando os resultados da análise histológica que demonstraram mais formação óssea no grupo TCP nos dois períodos. A análise histológica, em estudos^{23,47}, revelaram que implantes com revestimento biomimético de hidroxiapatita apresentaram significativamente maior extensão e área óssea em comparação com implantes CaP durante 4 a 12 semanas.

Um grande número de estudos na literatura relata os benefícios das modificações topográficas e químicas da superfície em torno dos implantes.^{16,27-29,41-47} No entanto, se a modificação da superfície pela método biomimético com a deposição de β -tricálcio fosfato resultará em resposta óssea mais rápida e/ou estabilidade biomecânica, carece de mais investigação.

CONCLUSÃO

VI. Conclusão

Os tratamentos biomiméticos da superfície dos implantes são válidos, uma vez que diante dos testes de estudo da topografia observou-se a formação da camada de apatia. A incorporação do β -tricálcio fosfato na superfície dos implantes de Ttcp, através da modificação do método biomimético, mostrou-se eficiente perante os testes de avaliação da superfície, que demonstraram maiores quantidades de Ca e P em relação ao tratamento biomimético convencional. Esse tipo de superfície também determinou uma maior formação óssea ao redor dos implantes dentários, influenciando diretamente o processo de osseointegração.

REFERÊNCIAS

1. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont*. 2004;17(5):536-43.
2. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;4(4):172-84.
3. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Bone reactions adjacent to titanium implants with different surface characteristics subjected to static load. A study in the dog (II). *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(3):196-201.
4. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991;25(7):889-902.
5. Strnad Z, Strnad J, Povýsil C, Urban K. Effect of plasma-sprayed hydroxyapatite coating on the osteoconductivity of commercially pure titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15(4):483-90.

6. London RM, Roberts FA, Baker DA, Rohrer MD, O'Neal RB. Histologic comparison of a thermal dual-etched implant surface to machined, TPS, and HA surfaces: bone contact in vivo in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(3):369-76.
7. Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15(5):675-90.
8. Picraux ST, Pope LE. Tailored surface modification by ion implantation and LASER treatment. *Science.* 1984;9;226(4675):615-22.
9. Gaggl A, Schultes G, Müller WD, Kärcher H. Scanning electron microscopical analysis of LASER-treated titanium implant surfaces--a comparative study. *Biomaterials.* 2000;21(10):1067-73.
10. Shin SI, Min HK, Park BH, Kwon YH, Park JB, Herr Y, Heo SJ, Chung JH. The effect of Er:YAG LASER irradiation on the scanning electron microscopic structure and surface roughness of various implant surfaces: an in vitro study. *LASERs Med Sci.* 2011;26(6):767-76.
11. Atalay B, Aybar B, Ergüven M, Emes Y, Bultan Ö, Akça K, Yalçın S, Baysal U, İşsever H, Çehreli MC, Bilir A. The effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) on osteoblast-like cells cultured on titanium and titanium-zirconium

- surfaces. *J Craniofac Surg.* 2013;24(6):2127-34.
12. Ayobian-Markazi N, Karimi M, Safar-Hajhosseini A. Effects of Er: YAG LASER irradiation on wettability, surface roughness, and biocompatibility of SLA titanium surfaces: an in vitro study. *LASERs Med Sci.* 2015 ;30(2):561-6.
 13. Charles PD, Anandapandian PA, Samuel S. Osteogenic potential of LASER modified and conditioned titanium zirconium surfaces. *J Indian Prosthodont Soc.* 2016;16(3):253-8.
 14. Hindy A, Farahmand F, Tabatabaei FS. In vitro biological outcome of LASER application for modification or processing of titanium dental implants. *LASERs Med Sci.* 2017 Jul;32(5):1197-1206.
 15. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by LASER beam: biomechanical study in rabbit tibias. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(8):1706-15.
 16. Sisti KE, de Rossi R, Antonioli AM, Aydos RD, Guastaldi AC, Queiroz TP, Garcia IR Jr, Piattelli A, Tavares HS. Surface and biomechanical study of titanium implants modified by LASER with and without hydroxyapatite coating, in rabbits. *J Oral Implantol.* 2012;38(3):231-7.

17. Queiroz TP, Souza FÁ, Guastaldi AC, Margonar R, Garcia-Júnior 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 Implants Res.* 2013;24(8):896-903.
18. Sisti KE, Piattelli A, Guastaldi AC, Queiroz TP, de Rossi R. Nondecalcified histologic study of bone response to titanium implants topographically modified by LASER with and without hydroxyapatite coating. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2013;33(5):689-96.
19. Queiroz TP, de Molon RS, Souza FÁ, Margonar R4, Thomazini AH5, Guastaldi AC5, Hochuli-Vieira E6. In vivo evaluation of cp Ti implants with modified surfaces by LASER beam with and without hydroxyapatite chemical deposition and without and with thermal treatment: topographic characterization and histomorphometric analysis in rabbits. *Clin Oral Investig.* 2017;21(2):685-699.
20. Bryington MS, Hayashi M, Kozai Y, Vandeweghe S, Andersson M, Wennerberg A, Jimbo R. The influence of nano hydroxyapatite coating on osseointegration after extended healing periods. *Dent Mater.* 2013;29(5):514-20.
21. Mistry S, Kundu D, Datta S, Basu D. Comparison of bioactive glass coated and hydroxyapatite coated titanium dental implants in the human jaw bone.

- Aust Dent J. 2011;56(1):68-75.
22. Van Oirschot BA, Alghamdi HS, Närhi TO, Anil S, Al Farraj Aldosari A, van den Beucken JJ, Jansen JA. In vivo evaluation of bioactive glass-based coatings on dental implants in a dog implantation model. Clin Oral Implants Res. 2014;25(1):21-8.
23. Yang GL, He FM, Song E, Hu JA, Wang XX, Zhao SF. In vivo comparison of bone formation on titanium implant surfaces coated with biomimetically deposited calcium phosphate or electrochemically deposited hydroxyapatite. Int J Oral Maxillofac. 2010;25(4):669-80.
24. Alghamdi HS, van Oirschot BA, Bosco R, van den Beucken JJ, Aldosari AA, Anil S, Jansen JA. Biological response to titanium implants coated with nanocrystals calcium phosphate or type 1 collagen in a dog model. Clin Oral Implants Res. 2013;24(5):475-83 26.
25. Mistry S, Roy R, Kundu B, Datta S, Kumar M, Chanda A, Kundu D. Clinical Outcome of Hydroxyapatite Coated, Bioactive Glass Coated, and Machined Ti6Al4V Threaded Dental Implant in Human Jaws: A Short-Term Comparative Study. Implant Dent. 2016;25(2):252-60.
26. Mistry S, Roy S, Jyoti Maitra N, Roy R, Datta S, Chanda A, Sarkar S. Safety and efficacy of additive and subtractive surface modification of Ti6Al4V endosseous implant in goat bone. J Mech Behav Biomed Mater.

- 2016;57:69-87.
27. Barrère F, Layrolle P, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Biomimetic coatings on titanium: a crystal growth study of octacalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med.* 2001;12(6):529-34.
 28. Wang J, Layrolle P, Stigter M, de Groot K. Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical characteristics and cell attachment. *Biomaterials.* 2004;25(4):583-92.
 29. Aparecida AH, Fook MV, Guastaldi AC. Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(6):1215-22.
 30. Lin X, de Groot K, Wang D, Hu Q, Wismeijer D2, Liu Y2. A review paper on biomimetic calcium phosphate coatings. *Open Biomed Eng J.* 2015; 27;9:56-64.
 31. Fuming H, Guoli Y, Xiaoxiang W, Shifang Z. The removal torque of titanium implant inserted in rabbit femur coated with biomimetic deposited Ca-P coating. *J Oral Rehabil.* 2008;35(10):754-65.
 32. Jonášová L, Müller FA, Helebrant A, Strnad J, Greil P. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials.* 2004;25(7-8):1187-94.

33. Asai S, Shimizu Y, Ooya K. Effect of occluded nasal ostium in sinus augmentation model Clin Oral Impl 2005;13:405-9.
34. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. J Bone Miner Res. 2010;25(7):1468-86.
35. Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia Júnior IR, Vieira EH. J Oral Maxillofac Surg. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. J Oral Maxillofac Surg. 2008;66(6):1233-40.
36. Novellino MM, Sesma N, Zanardi PR, Laganá DC. Resonance frequency analysis of dental implants placed at the posterior maxilla varying the surface treatment only: A randomized clinical trial. Clin Implant Dent Relat Res. 2017;1-6.
37. Meredith N, Alleyne D, Cawley P. Quantitative determination of the stability of the implant-tissue interface using resonance frequency analysis. Clin Oral Implant Res. 1996;7(3):261-7.
38. Rajiv K Gupta, Thallam V Padmanabhan. Resonance frequency analysis. Indian J Dent Res. 2011;22(4):567-73.

39. Friberg B, Sennerby L, Meredith N, Lekholm U. A comparison between cutting torque and resonance frequency measurements of maxillary implants. A 20-month clinical study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1999;28(4):297-303.
40. Soares PB, Moura CC, Claudino M, Carvalho VF, Rocha FS, Zanetta-Barbosa D. Influence of Implant Surfaces on Osseointegration: A Histomorphometric and Implant Stability Study in Rabbits. *Braz Dent J.* 2015;26(5):451-7.
41. Fuming H, Guoli Y, Xiaoxiang W, Shifang Z. The removal torque of titanium implant inserted in rabbit femur coated with biomimetic deposited Ca-P coating. *J Oral Rehabil.* 2008;35(10):754-65.
42. Hsiu-Wan Meng, Esther Yun Chien, Hua-Hong Chien. Dental implant bioactive surface modifications and their effects on osseointegration: a review. *Biomark Res.* 2016;4(24):1-14.
43. Al-Nawas B, Groetz KA, Goetz H, Duschner H, Wagner W. Comparative histomorphometry and resonance frequency analysis of implants with moderately rough surfaces in a loaded animal model. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(1):1-8.
44. Lee SY, Kim MJ, Kim SK, Heo SJ, Koak JY. Effect of biomimetic deposition on anodized titanium surfaces. *J Dent Res.* 2011;90(6):711-6.

45. Coelho PG, Granite R, Marin C, Bonfante EA, Janal MN, Suzuki M. Biomechanical and bone histomorphologic evaluation of four surfaces on plateau root form implants: an experimental study in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(5):39-45.
46. García-Gareta E, Hua J, Orera A, Kohli N, Knowles JC, Blunn GW. Biomimetic surface functionalization of clinically relevant metals used as orthopaedic and dental implants. *Biomed Mater.* 2017;13(1):87e6.
47. Yang GL, He FM, Hu JA, Wang XX, Zhao SF. Effects of biomimetically and electrochemically deposited nano-hydroxyapatite coatings on osseointegration of porous titanium implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(6):782-9.

Anexo A

Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

	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 β-tricálcio fosfato em levantamento da membrana sinusal. Estudo experimental de superfície, análise biomecânica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos", Processo FOA nº 2015-00360, 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 14 de Outubro de 2015.</p>		
VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Abril de 2018. DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Maio de 2018.		
CERTIFICATE		
<p>We certify that the study entitled "Titanium implants with treated surface by β-tricalcium phosphate in maxillary sinus augmentation. Experimental study of surface, biomechanical, histometric and immunohistochemistry analysis in rabbits", Protocol FOA nº 2015-00360, 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 October 14, 2015.</p>		
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 01, 2018. DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 01, 2018.		
 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 B

Normas da revista selecionada para publicação do artigo



Edited By: Lars Andersson

Impact Factor: 1.918

ISI Journal Citation Reports © Ranking:
2013: 45/82 (Elsevier)

Online ISSN: 1600-9657

FIGURAS

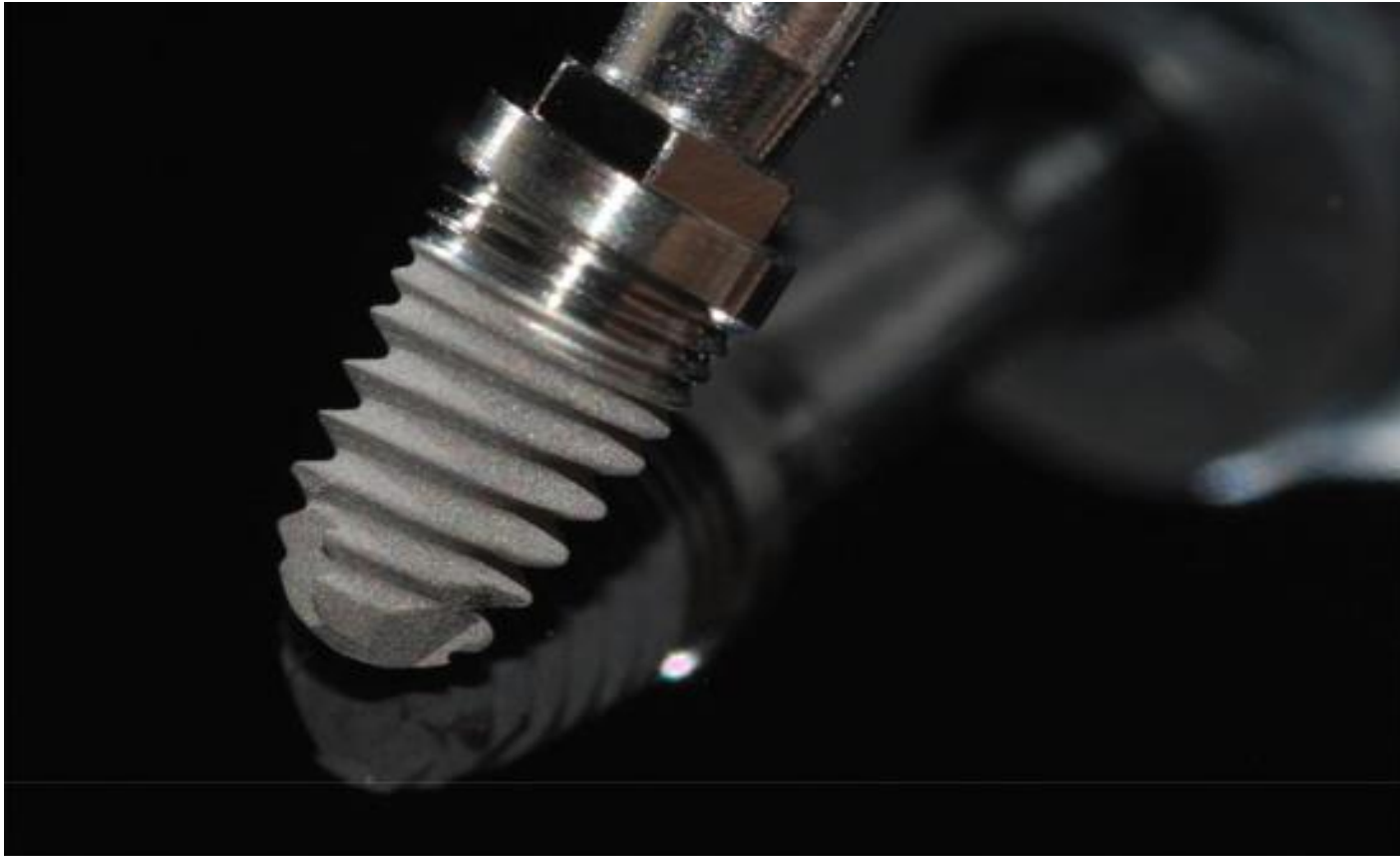


Fig. 1: Implante dentário de titânio comercialmente puro (Ticp), plataforma hexágono externo, diâmetro de 3,6mm e 6,5mm comprimento (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, linha Atrofic, Jales, SP, Brasil).



Fig. 2: Solução modificada de fluido corporal (Simulated Blody Fluid – SBF), que simula o fluido sanguíneo por apresentar composição iônica e pH semelhantes ao do plasma, sob agitação de 175 rpm durante 24 horas a 36,5 °C.



Fig. 3: Implantes imersos em Solução modificada de fluido corporal (Simulated Blody Fluid – SBF) associada ao β -tricálcio fosfato (TCP).

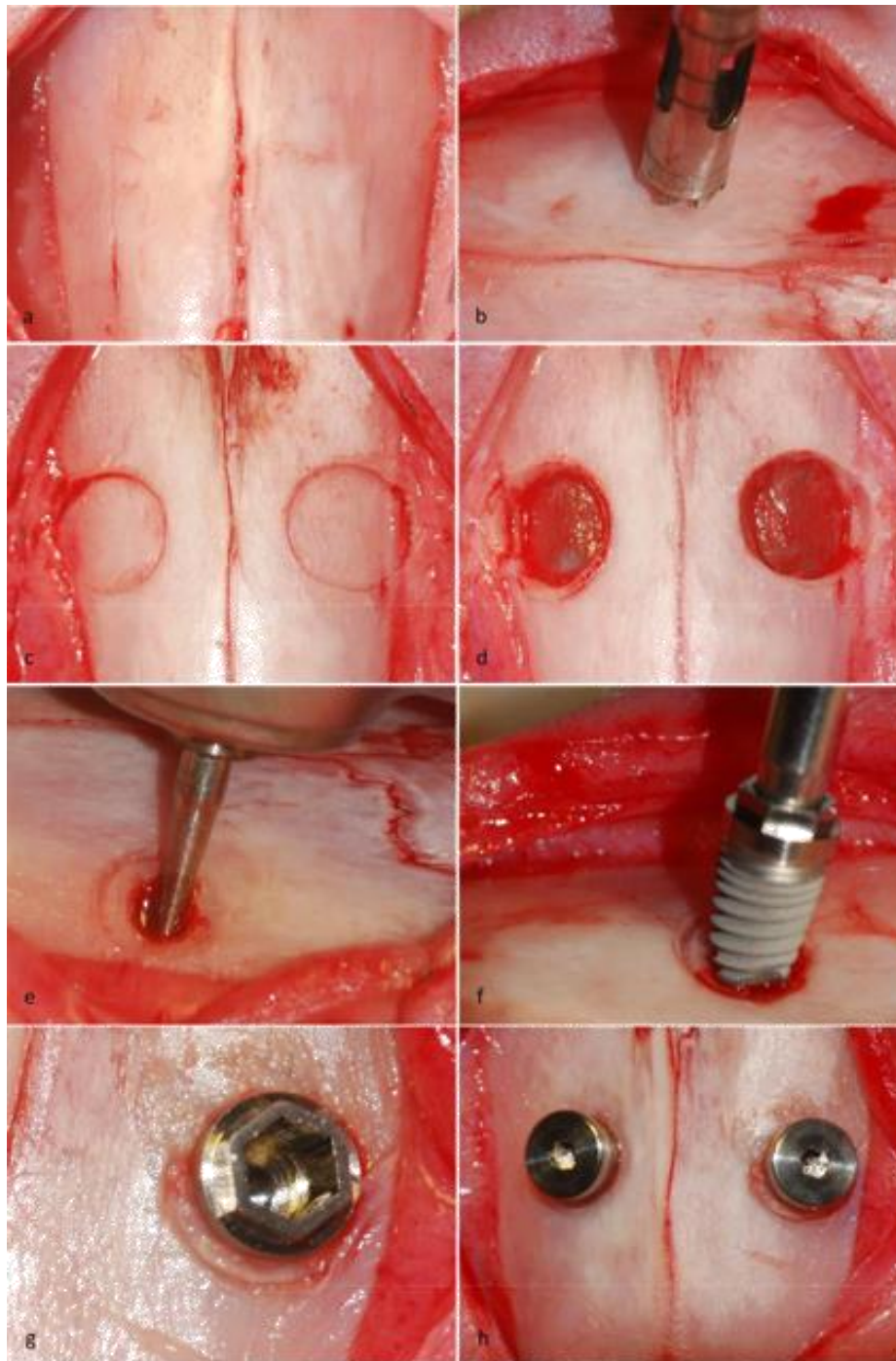


Fig. 4: Etapas do procedimento cirúrgico de instalação dos implantes dentários. (a) Exposição do dorso nasal, (b) Preparo da janela cirúrgica, elevação membrana sinusal (4c-4e) e instalação dos implantes dentários e dos parafusos de cobertura (4f-4h).

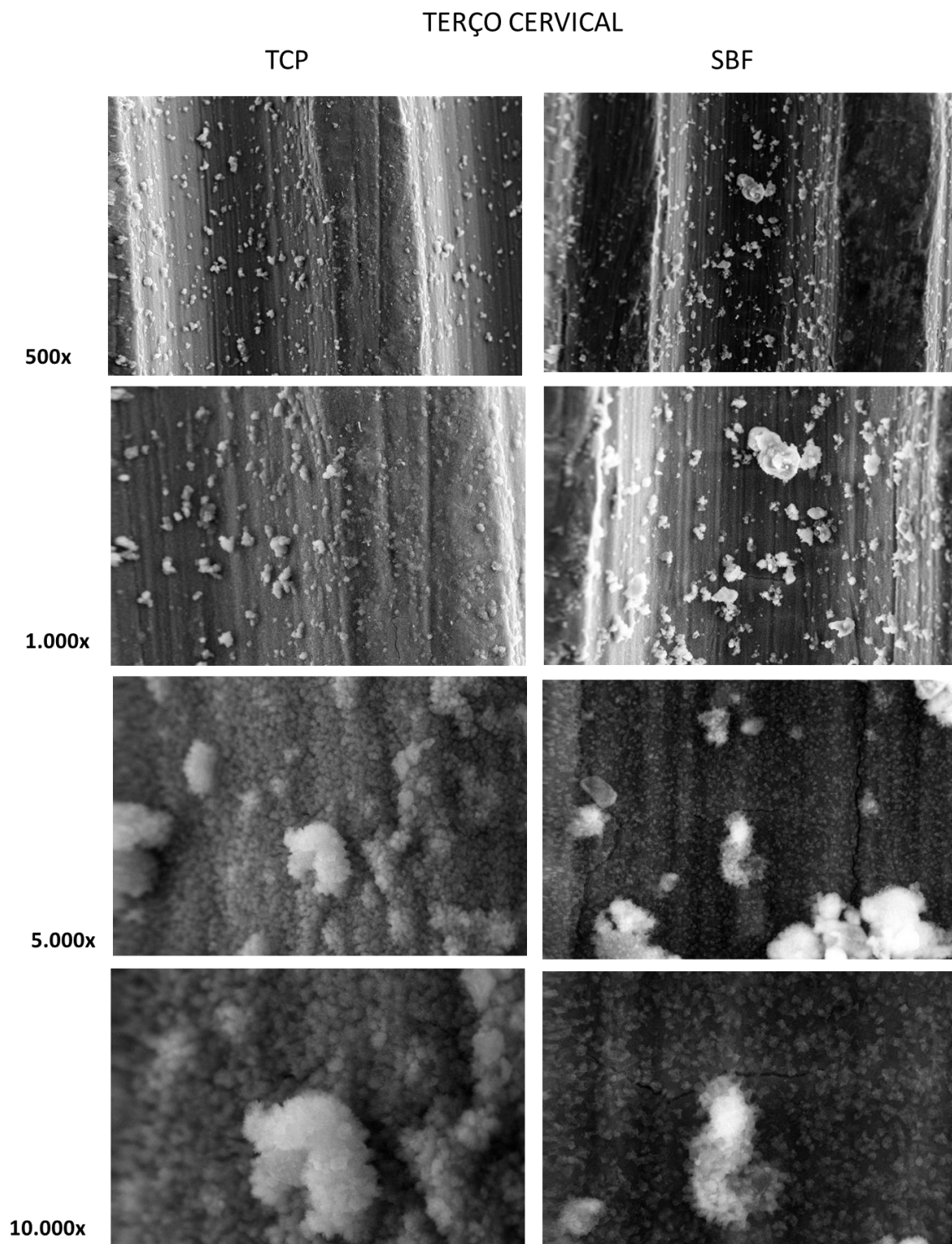


Fig. 5: Imagens da MEV do terço cervical da superfície dos implantes após imersão em SBF e modificado com β -tricálcio fosfato- TCP, nas magnificações de 500x, 1.000x, 5.000x e 10.000x.

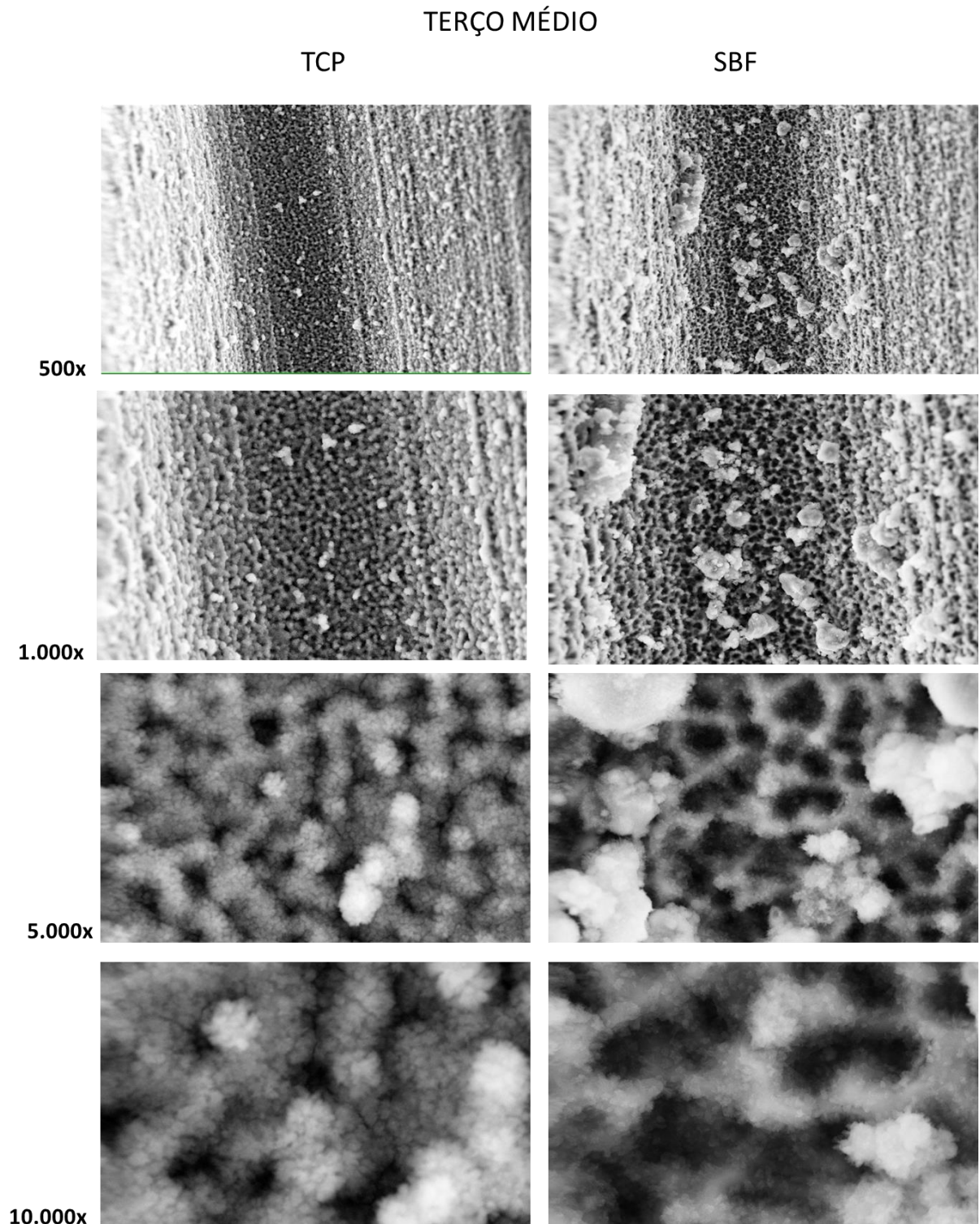


Fig. 6: Imagens da MEV do terço médio da superfície dos implantes após imersão em SBF e modificado com β - tricálcio fosfato- TCP, nas magnificações de 500x, 1.000x, 5.000x e 10.000x.

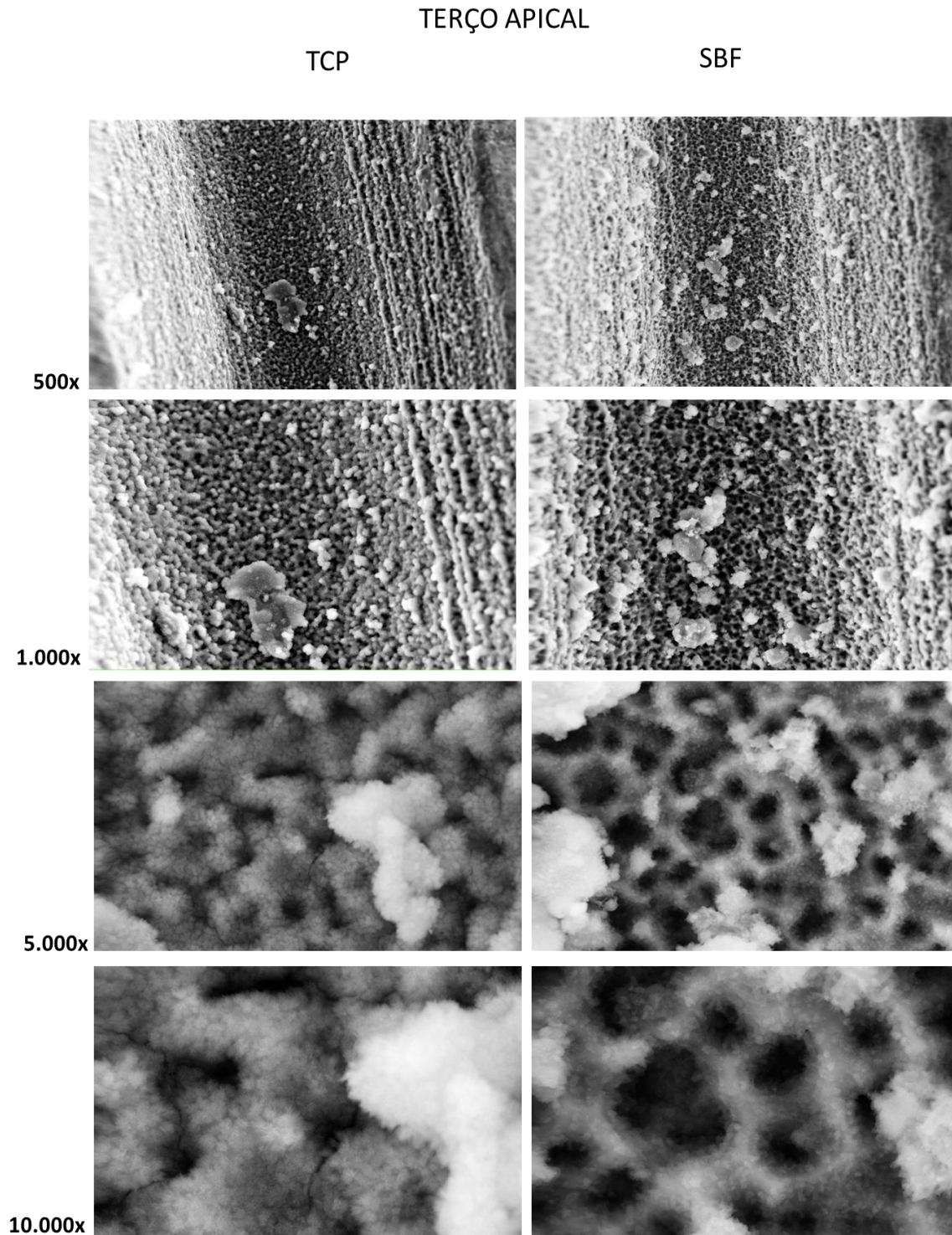


Fig. 7: Imagens da MEV do terço apical da superfície dos implantes após imersão em SBF e modificado com β - tricálcio fosfato- TCP, nas magnificações de 500x, 1.000x, 5.000x e 10.000x.

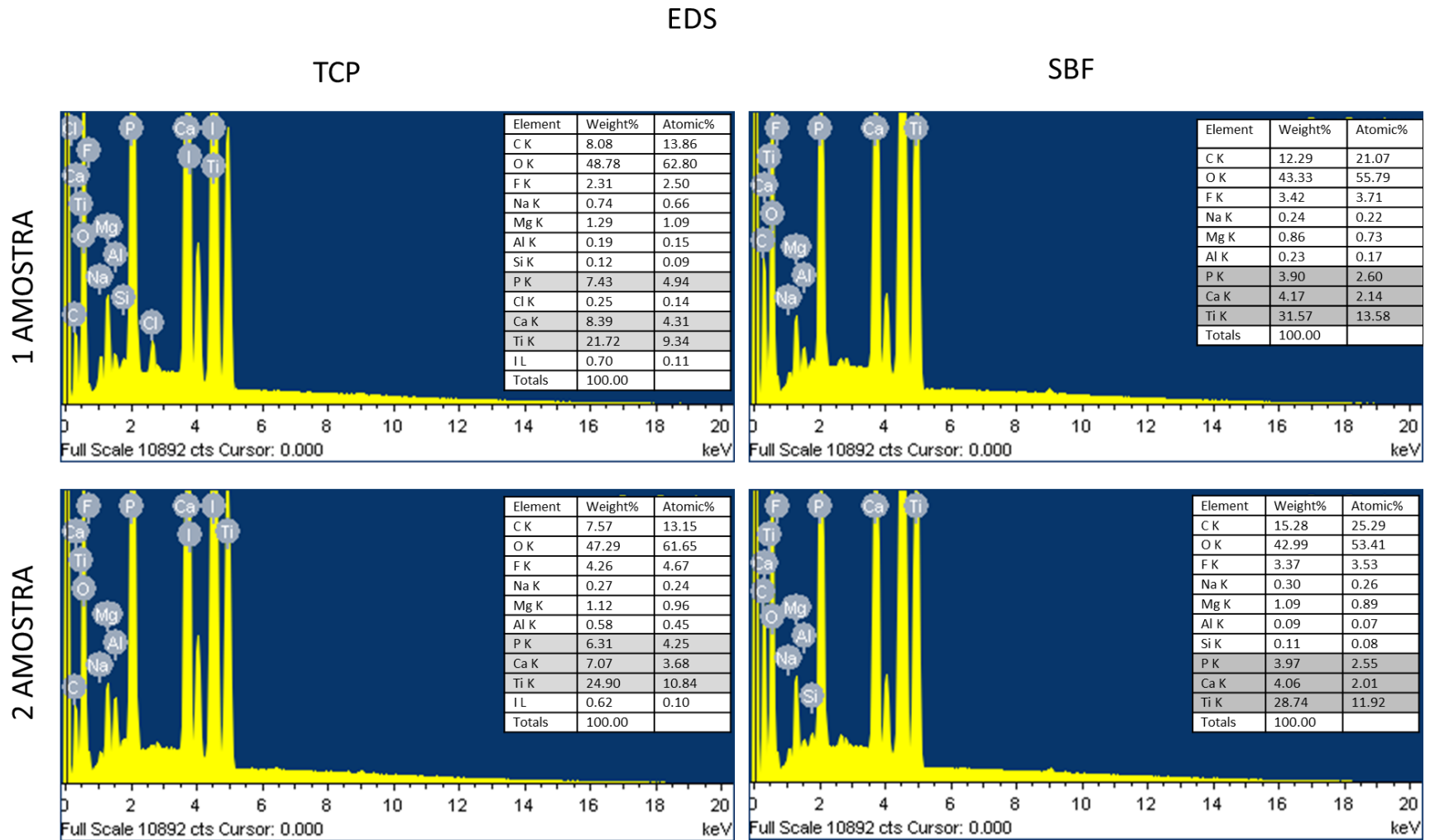


Fig. 8: Espectro de energia dispersiva - EDS da superfície dos implantes após imersão em SBF e modificado com β - tricálcio fosfato-TCP, demonstrando os picos dos elementos Ca, P e Ti.

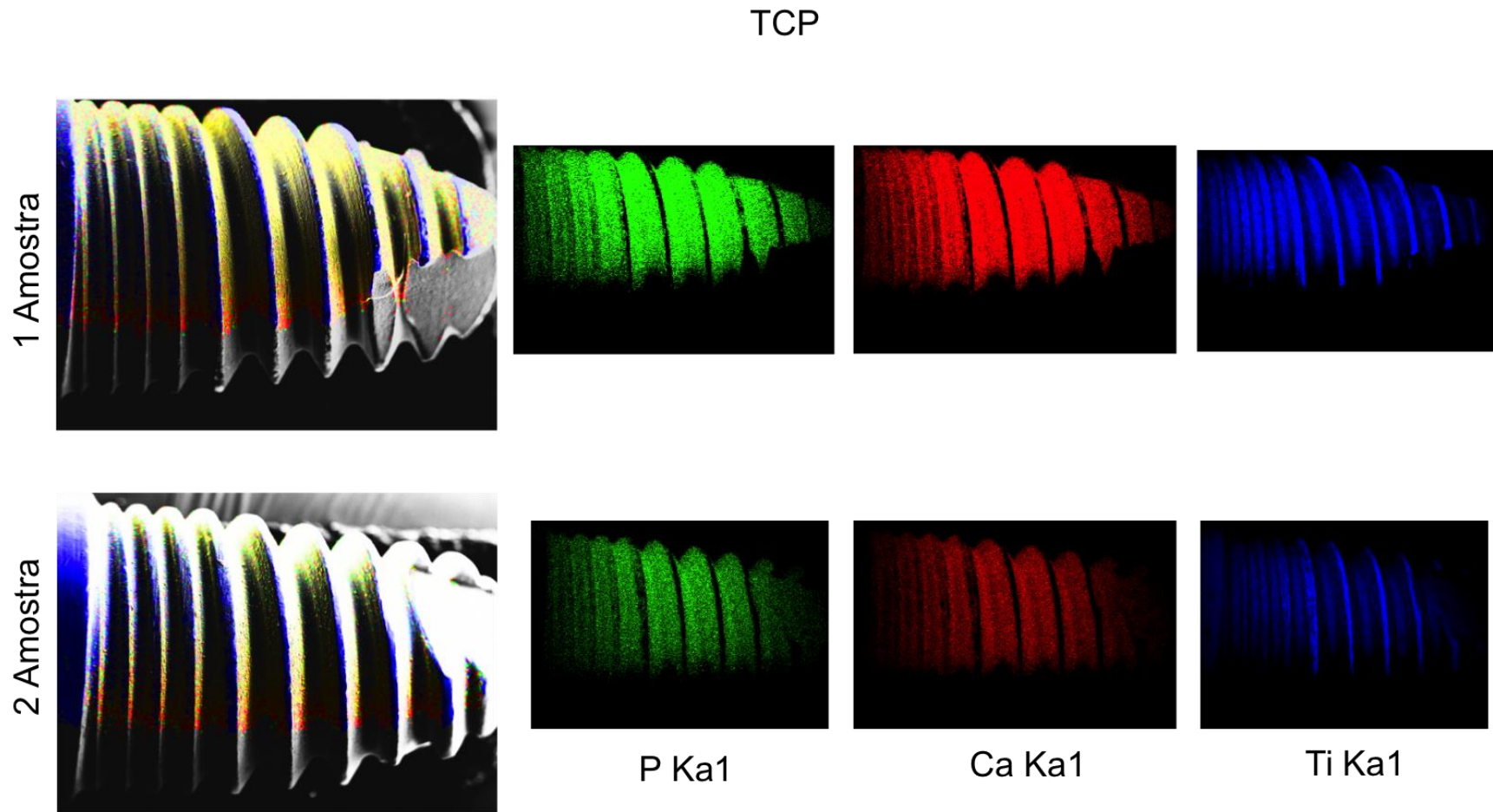


Fig. 9: Mapeamento dos elementos Ca (vermelho) e P (verde) nas superfícies dos implantes após imersão em SBF modificado com β -tricálcio fosfato- TCP. Observa-se camada de apatita (amarela) com maior distribuição dos íons Ca e P.

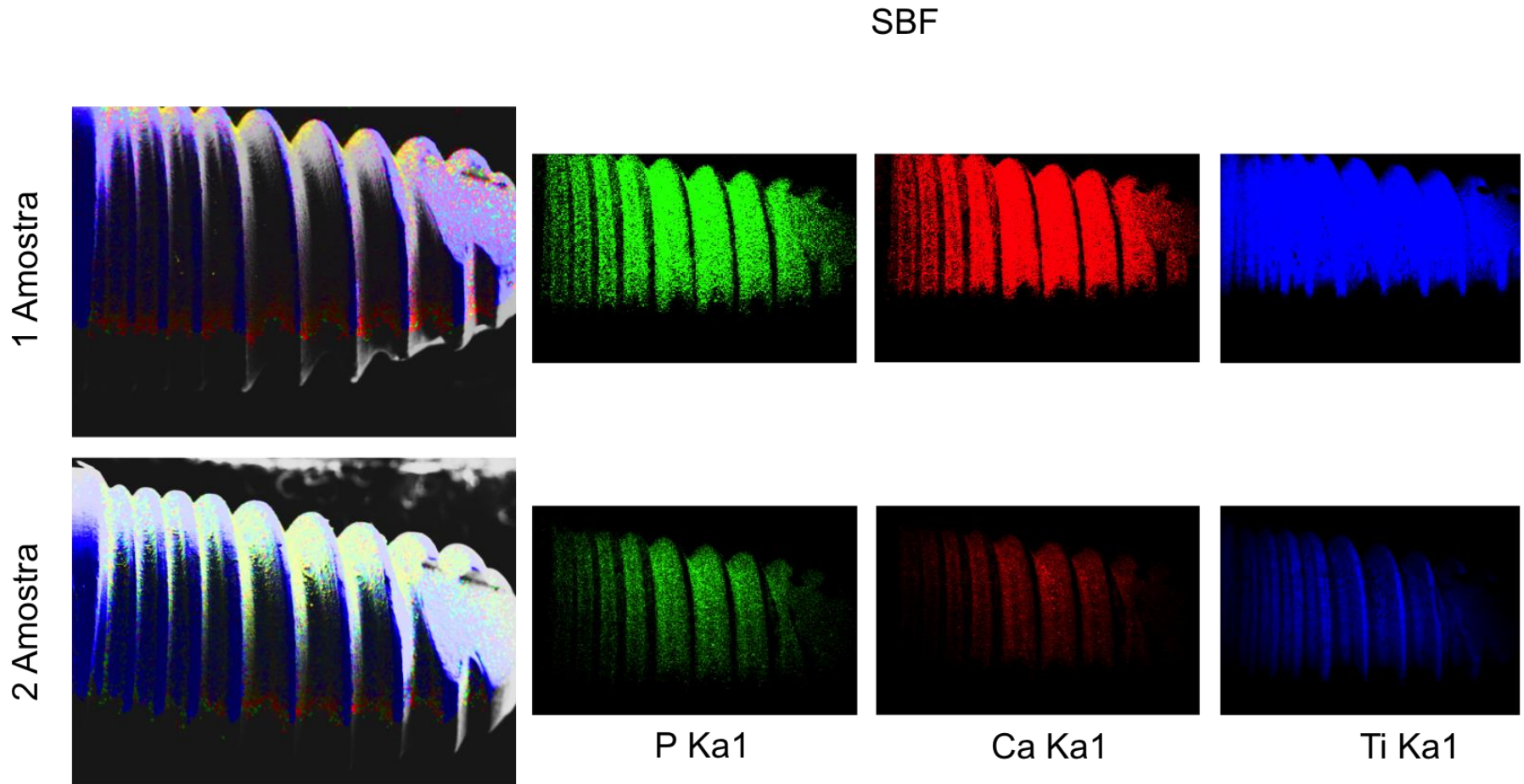


Fig. 10: Mapeamento da distribuição dos elementos Ca (vermelho) e P (verde) nas superfícies dos implantes após imersão em SBF. Observa-se formação da camada de apatita (amarela).

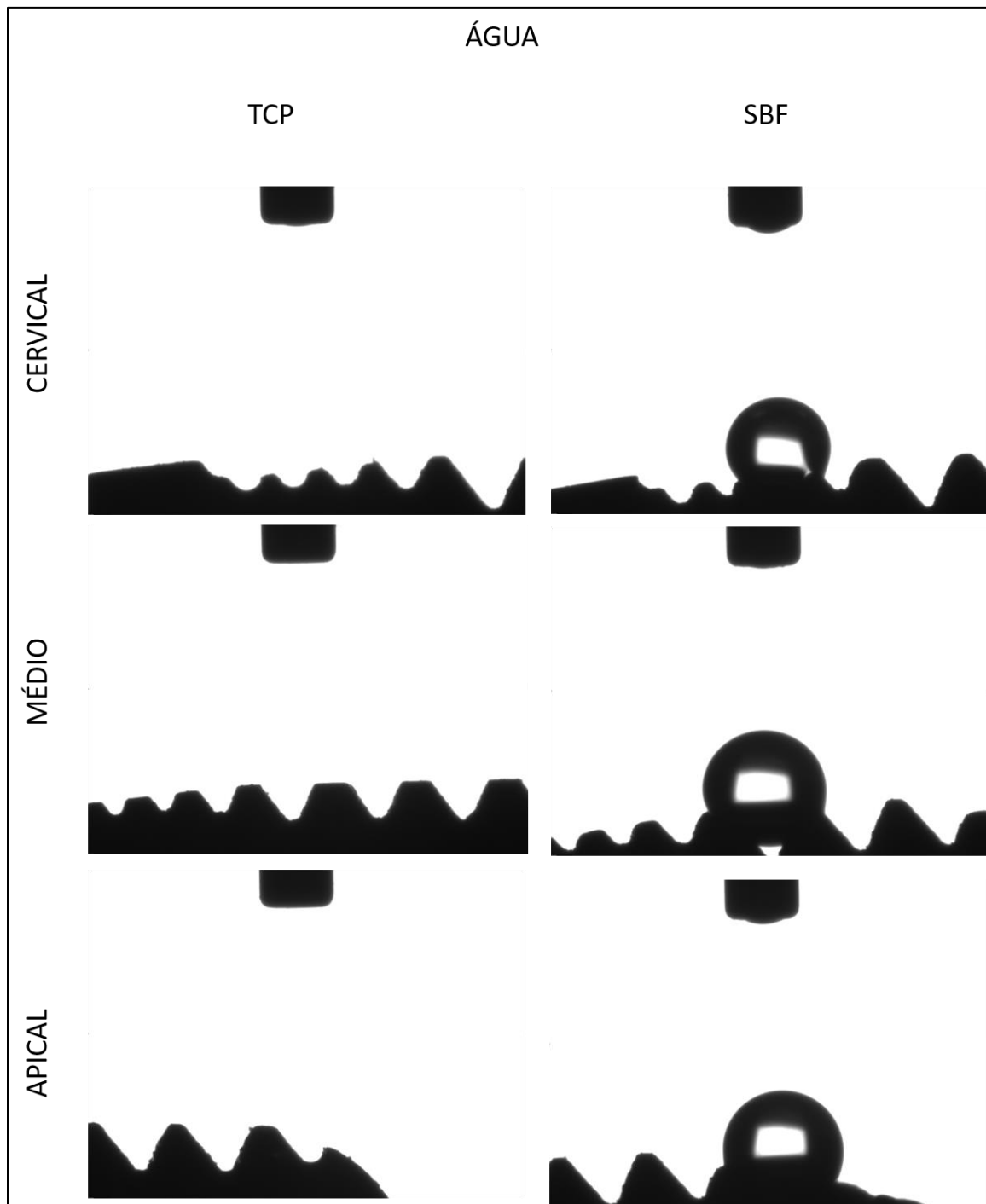


Fig. 11: Teste de Molhabilidade, em que gotículas de água foram pipetadas pelo goniômetro, com volume de queda de 3,6 μ L, sobre as porções das diferentes superfícies dos implantes.

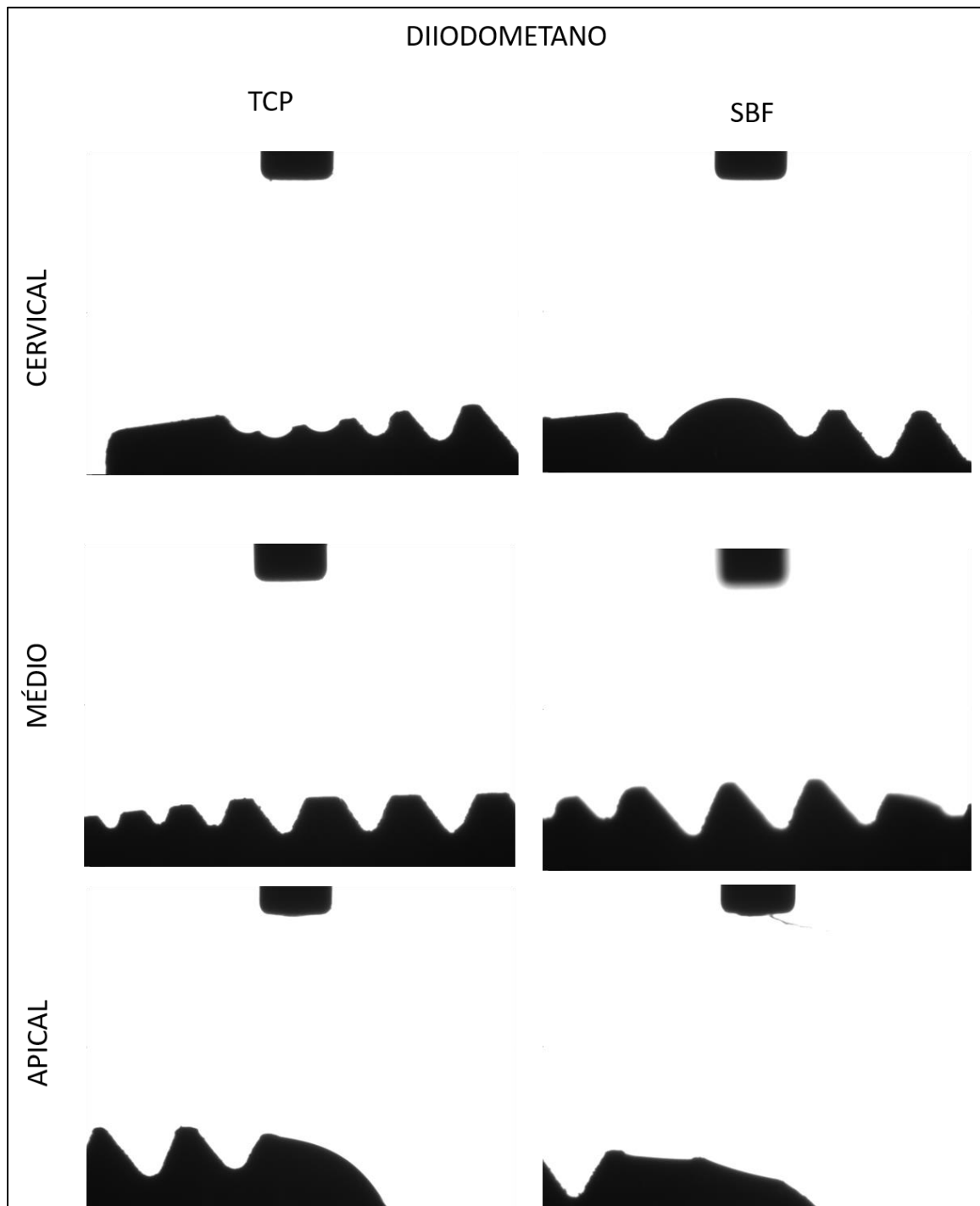


Fig. 12: Teste de Molhabilidade, em que gotículas de diiodometano foram pipetadas pelo goniômetro, com volume de queda de 3,6 μ L, sobre as porções das diferentes superfícies dos implantes.

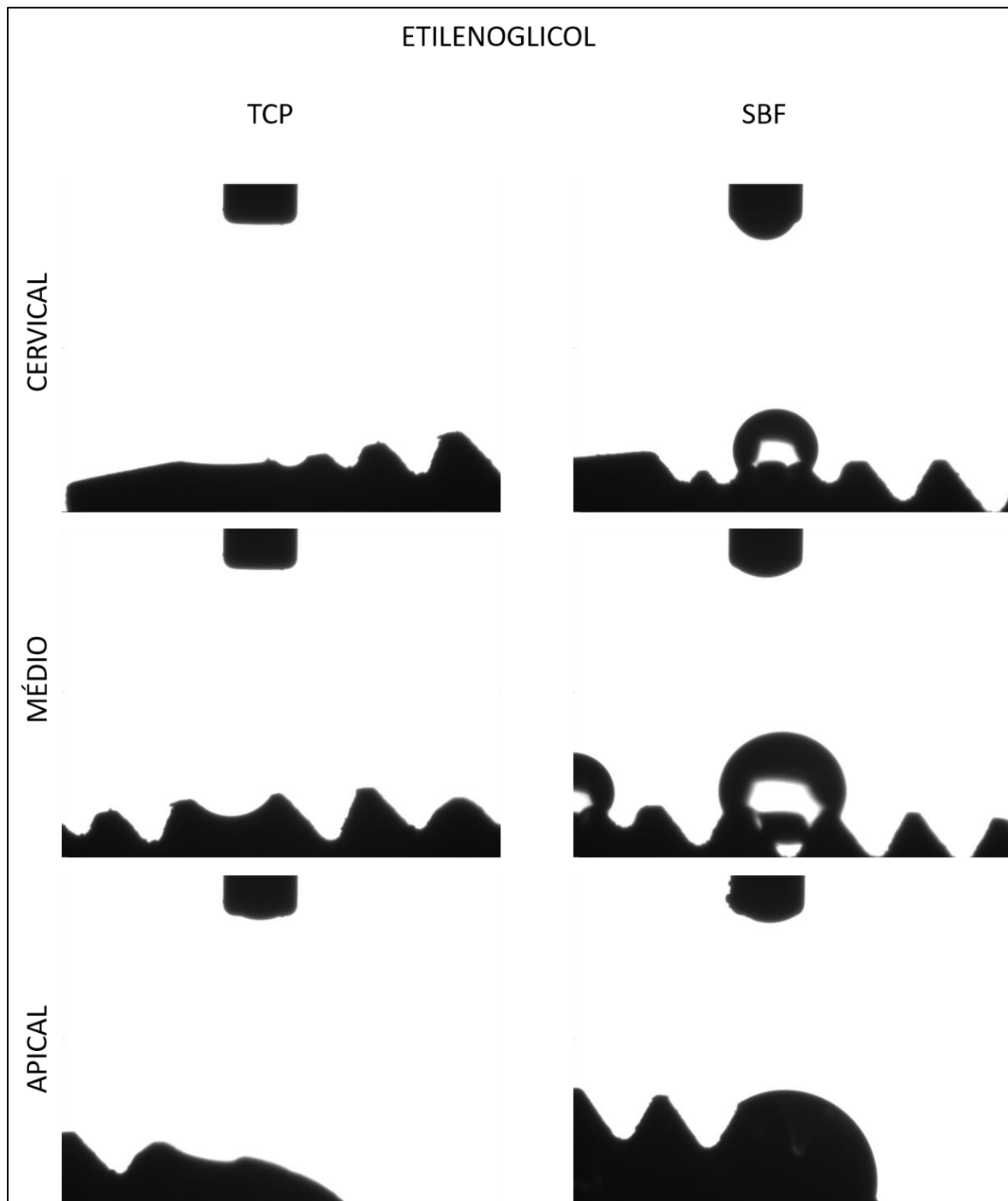


Fig. 13: Teste de Molhabilidade, em que gotículas de etilenoglicol foram pipetadas pelo goniômetro, com volume de queda de $3,6\mu\text{L}$, sobre as porções das diferentes superfícies dos implantes.

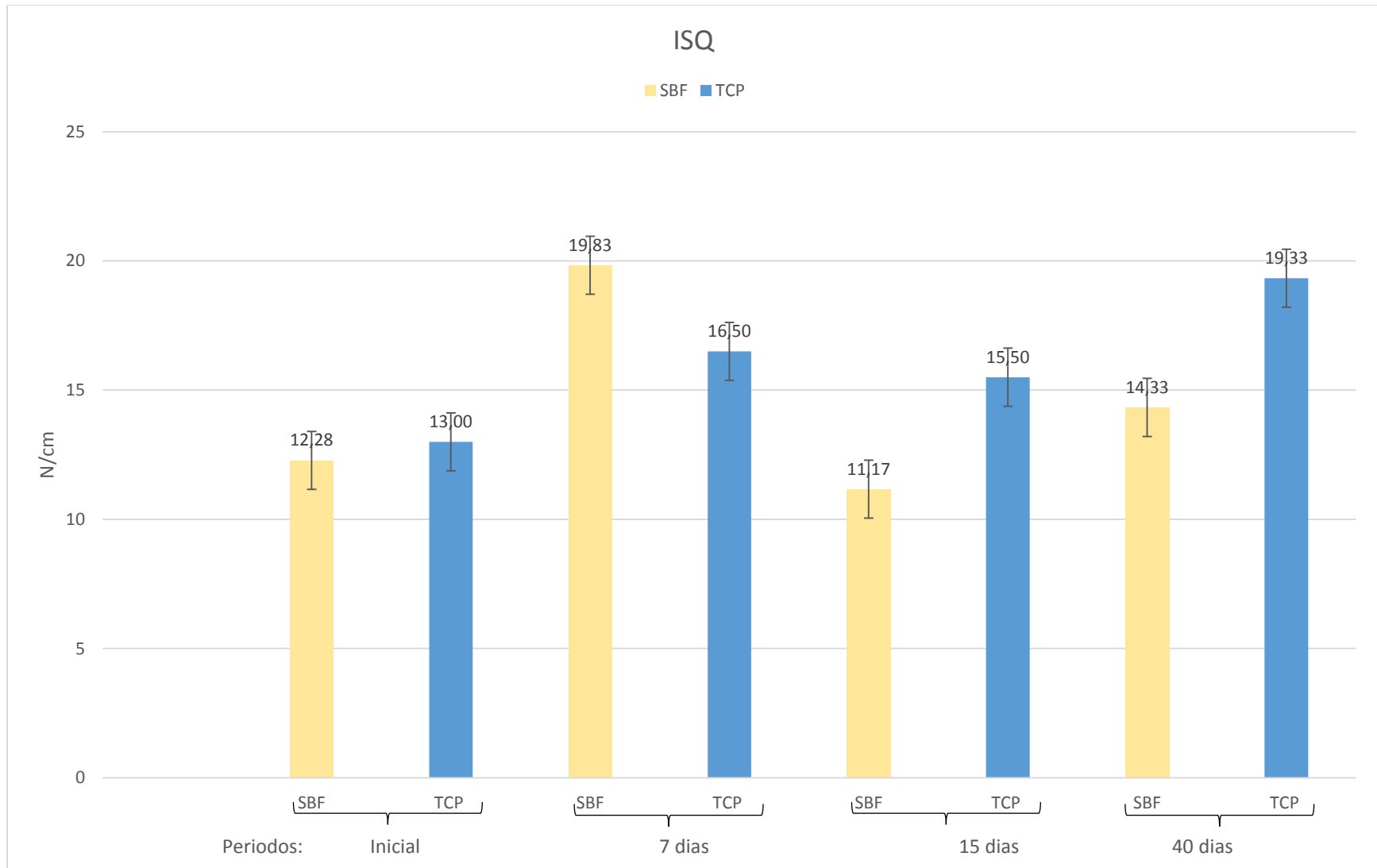


Fig. 14: Gráfico do ISQ por meio das médias em N/cm, entre os grupos SBF e TCP, nos diferentes períodos.

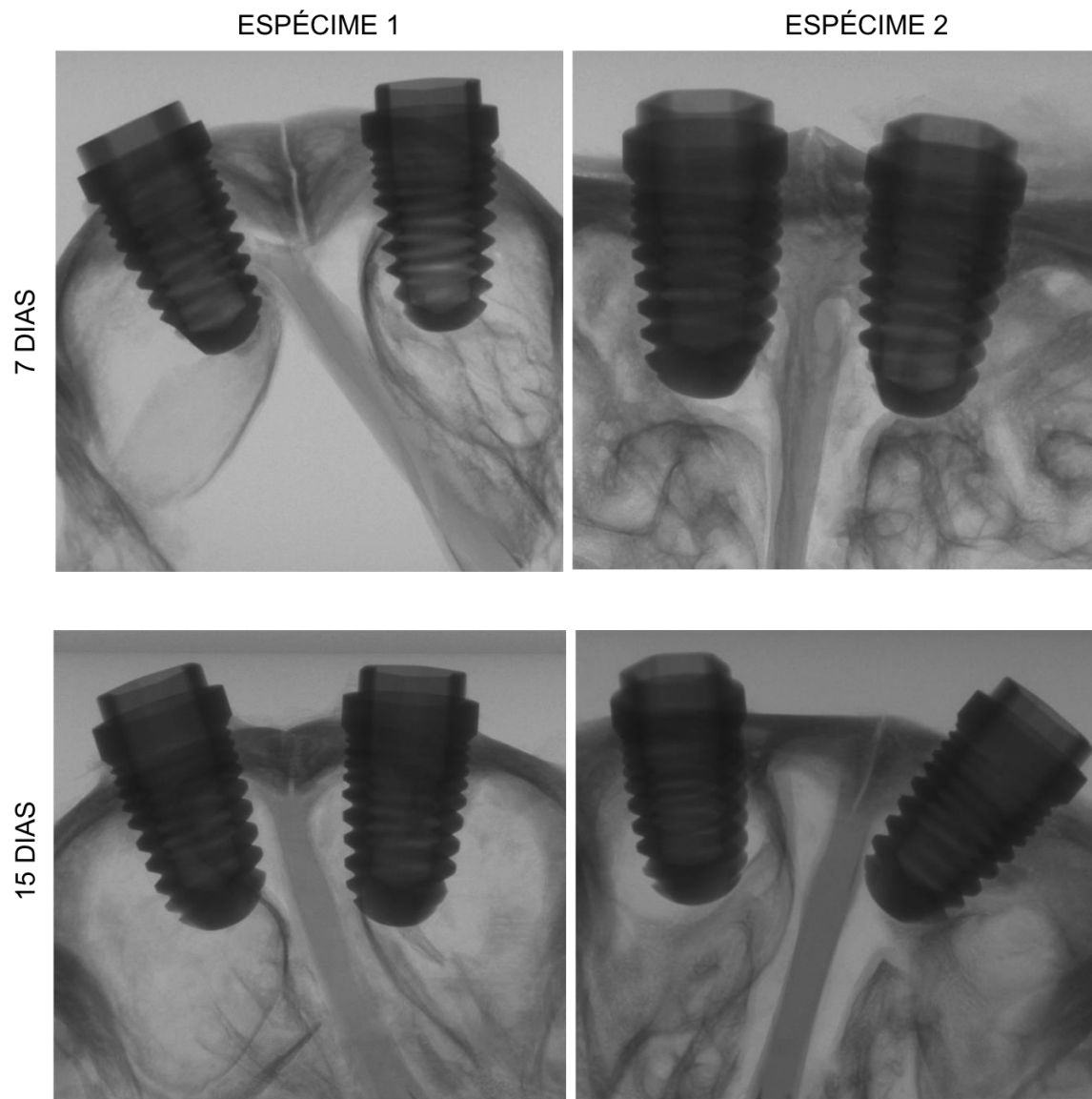


Fig. 15: Cortes coronais das microtomografias realizadas com janela para tecidos mineralizados nos espécimes dos períodos de 7 e 15 dias. Foi possível observar o posicionamento dos implantes no interior do seio maxilar direito (Grupo TCP) e esquerdo (Grupo SBF).

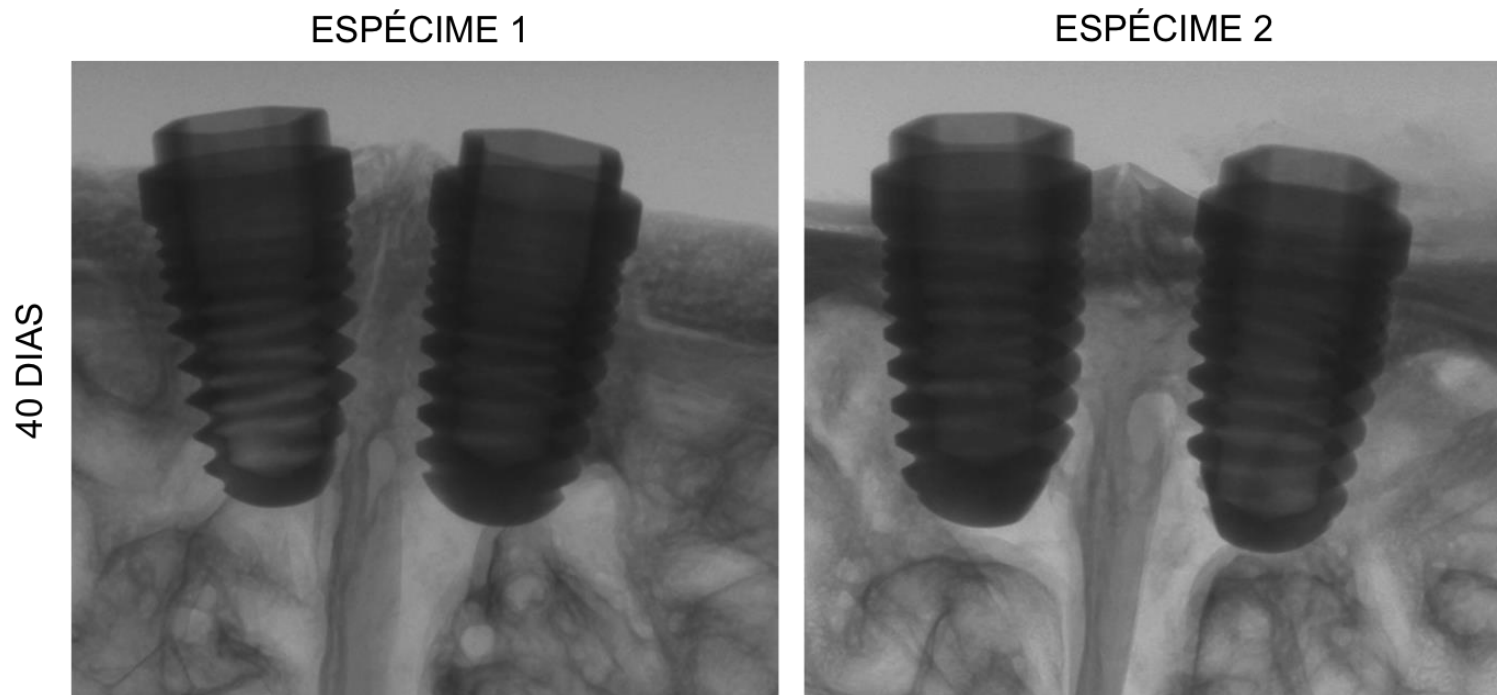


Fig. 16: Cortes coronais das microtomografias realizadas com janela para tecidos mineralizados nos espécimes do período de 40 dias. Foi possível observar o posicionamento dos implantes no interior do seio maxilar direito (Grupo TCP) e esquerdo (Grupo SBF).

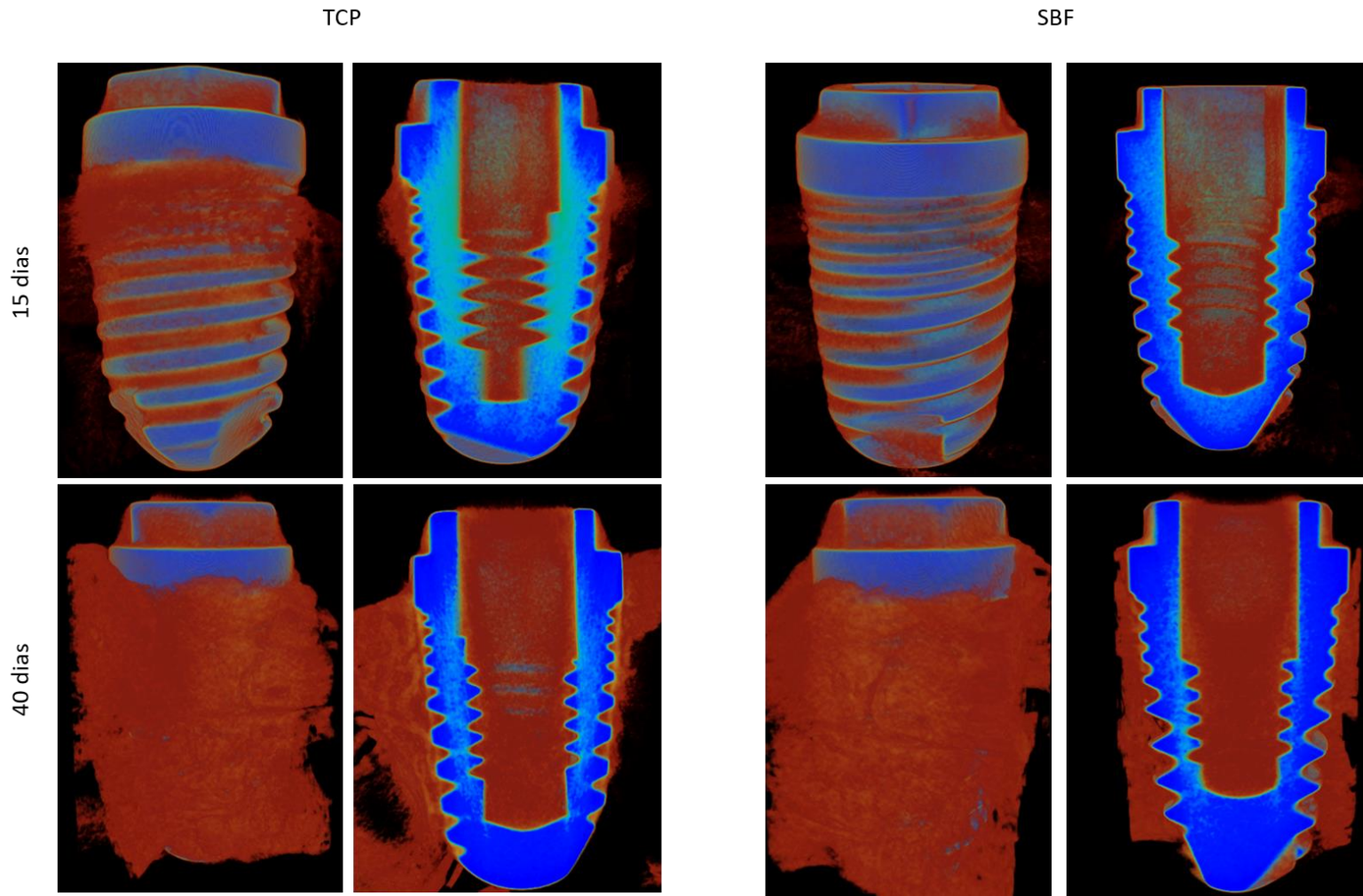


Fig. 17: Microtomografias com reconstrução em 3D, onde foi possível observar a formação óssea ao redor dos implantes, no período de 15 e 40 dias, nos grupos de implantes TCP e SBF.

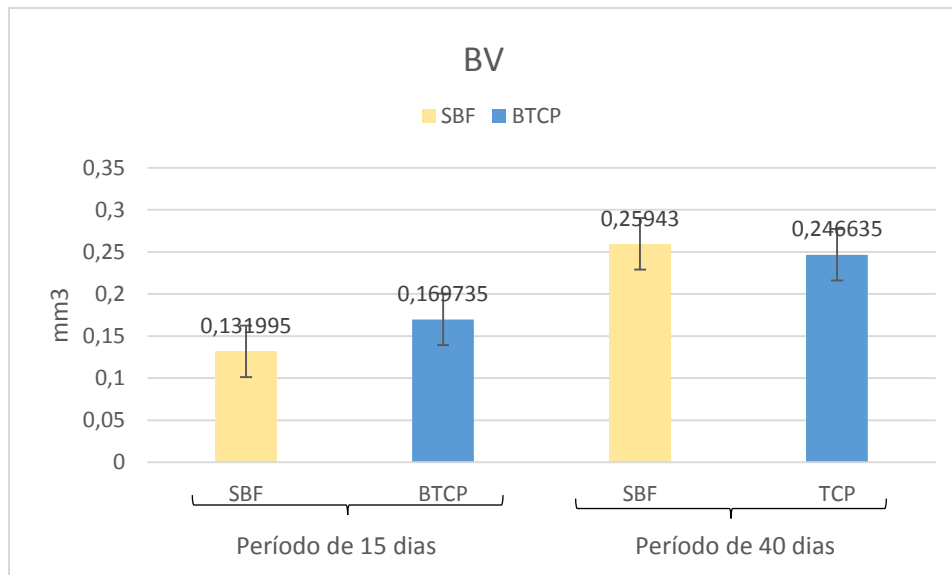


Fig. 18: Gráfico do BV comparando o volume de tecido ósseo por meio das médias em mm^3 , entre os grupos SBF e TCP, aos 15 e 40 dias.

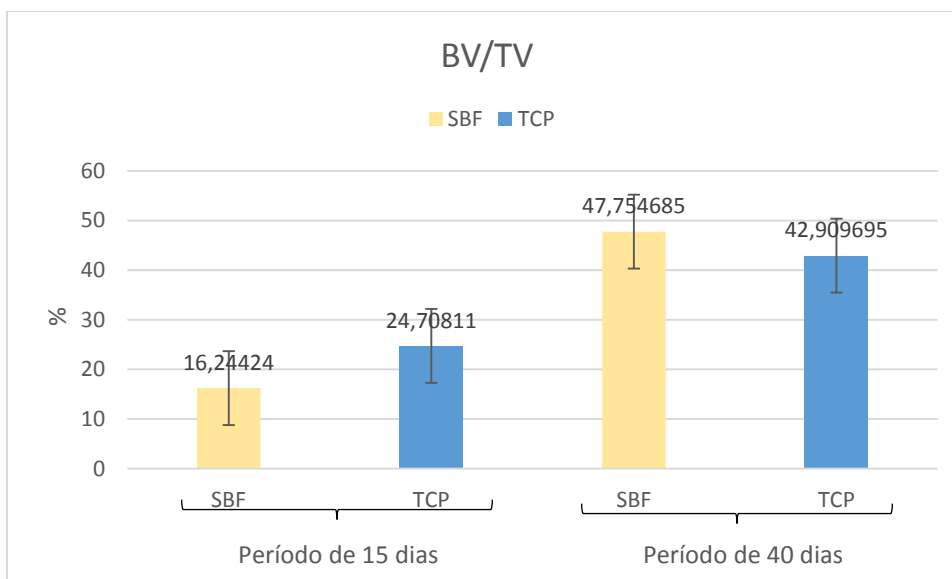


Fig. 19: Gráfico do BV/TV comparando a fração do volume ósseo em %, entre os grupos SBF e TCP, aos 15 e 40 dias.

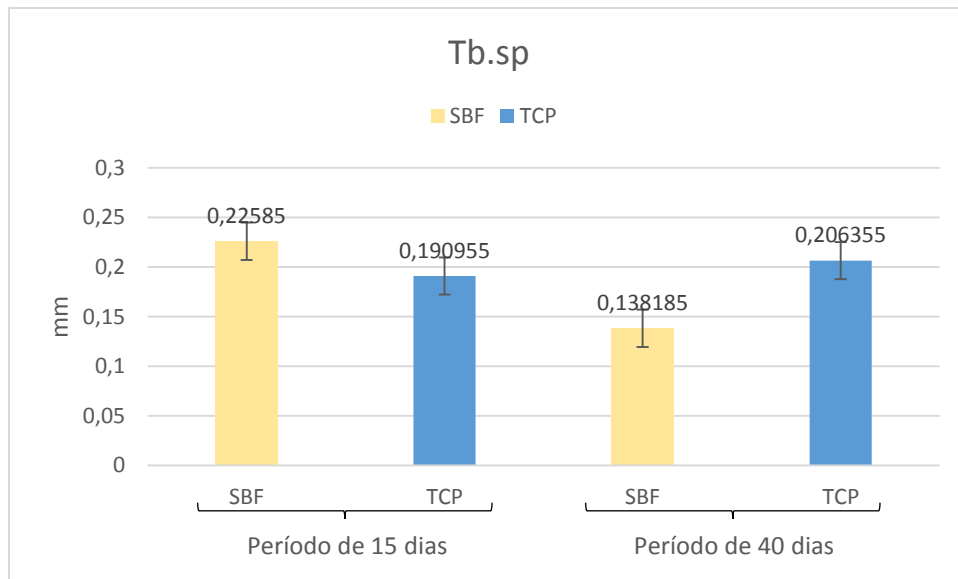


Fig. 20: Gráfico do Tb.sp comparando a porosidade trabeculada óssea, em mm, entre os grupos SBF e TCP, aos 15 e 40 dias.

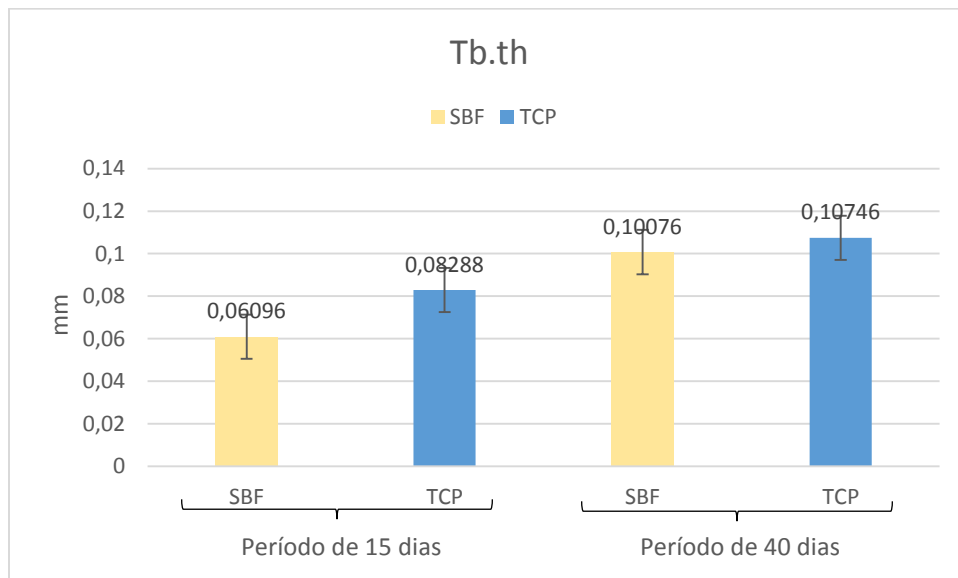


Fig. 21: Gráfico do Tb.th comparando a espessura do trabeculado ósseo, em mm, entre os grupos SBF e TCP, aos 15 e 40 dias.

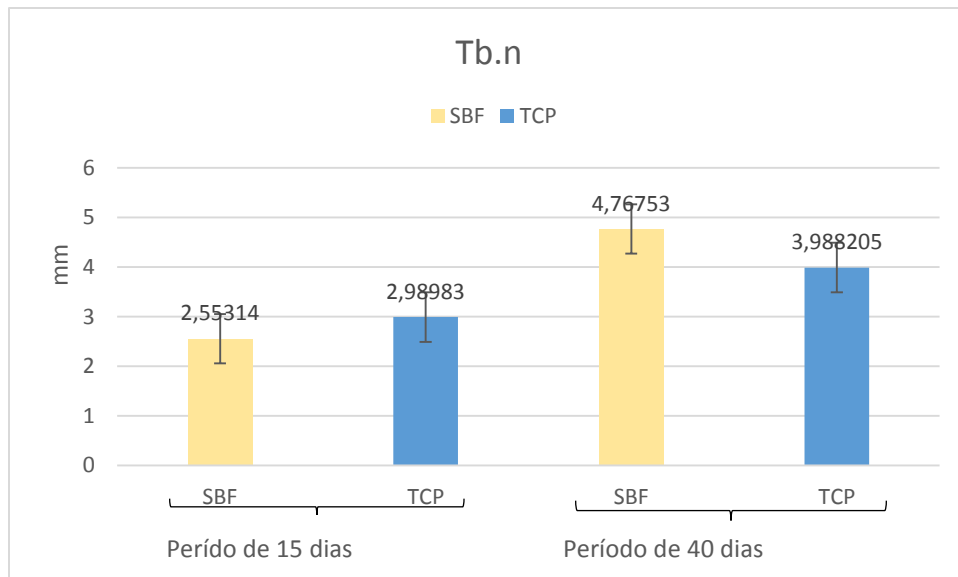


Fig. 22: Gráfico do Tb. N comparando o número do trabeculado ósseo em mm, entre os grupos SBF e TCP, aos 15 dias

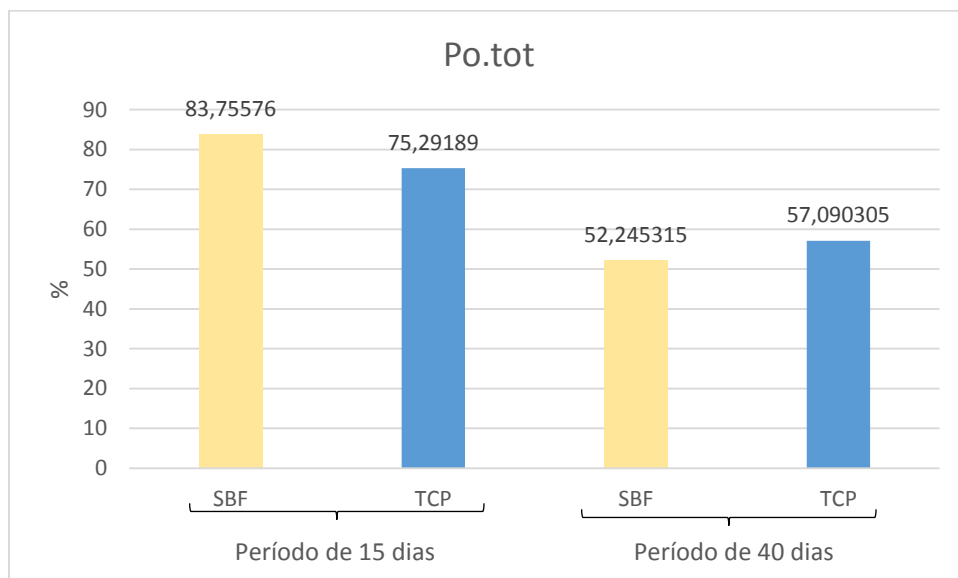


Fig. 23: Gráfico do Po.tot comparando a porosidade trabeculado ósseo, em %, entre os grupos SBF e TCP, aos 15 e 40 dias.

OSTEOCALCINA

SBF

TCP

40 dias

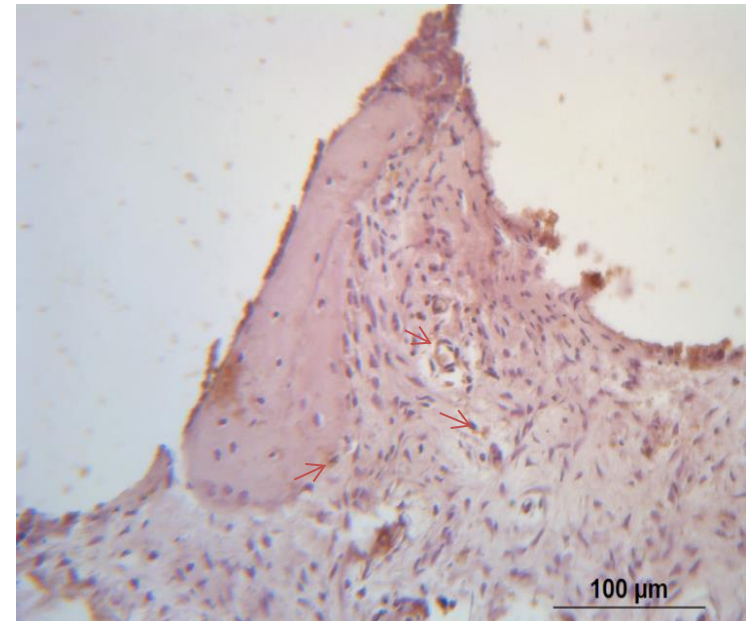
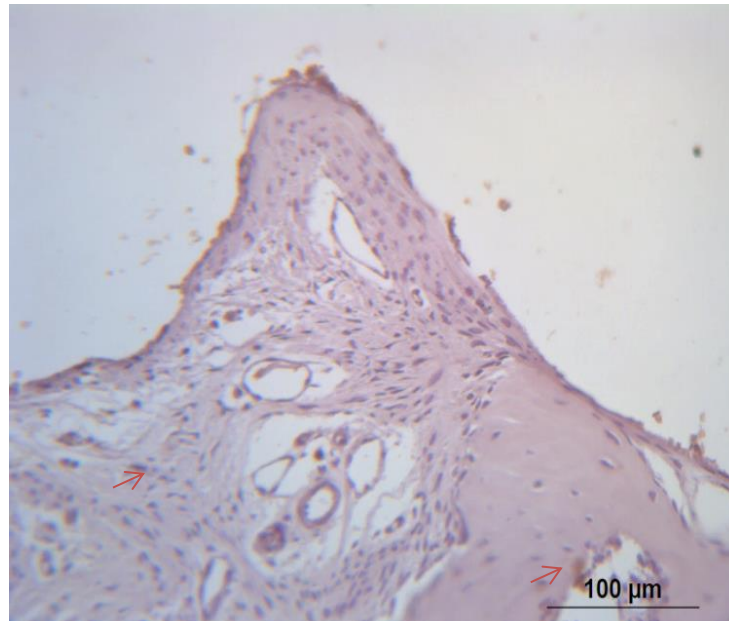


Fig. 24: Fotomicrografia da análise de imunohistoquímica demonstrando a marcação para a OCN (seta vermelha), nos grupos TCP e SBF, no período de 40 dias (25X).

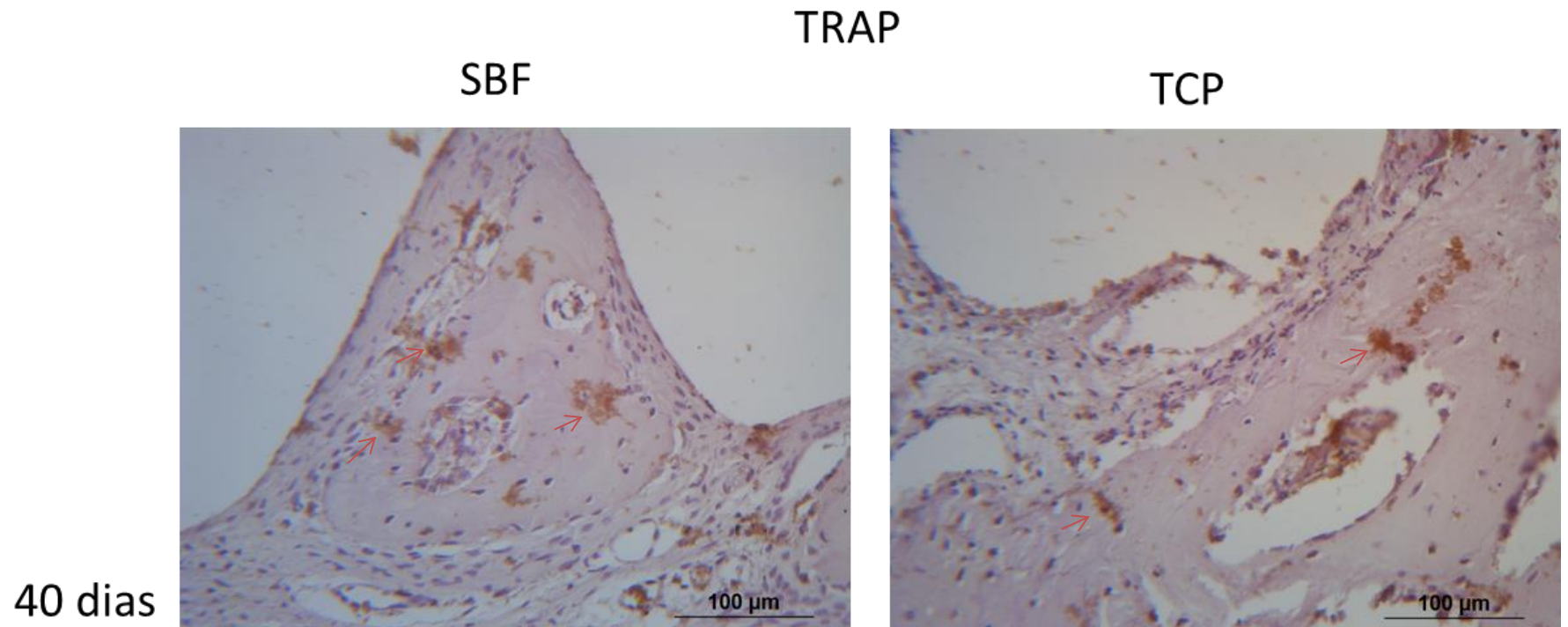


Fig. 25: Fotomicrografia da análise de imunohistoquímica demonstrando a marcação para a TRAP (seta vermelha), nos grupos TCP e SBF, no período de 40 dias (25X).

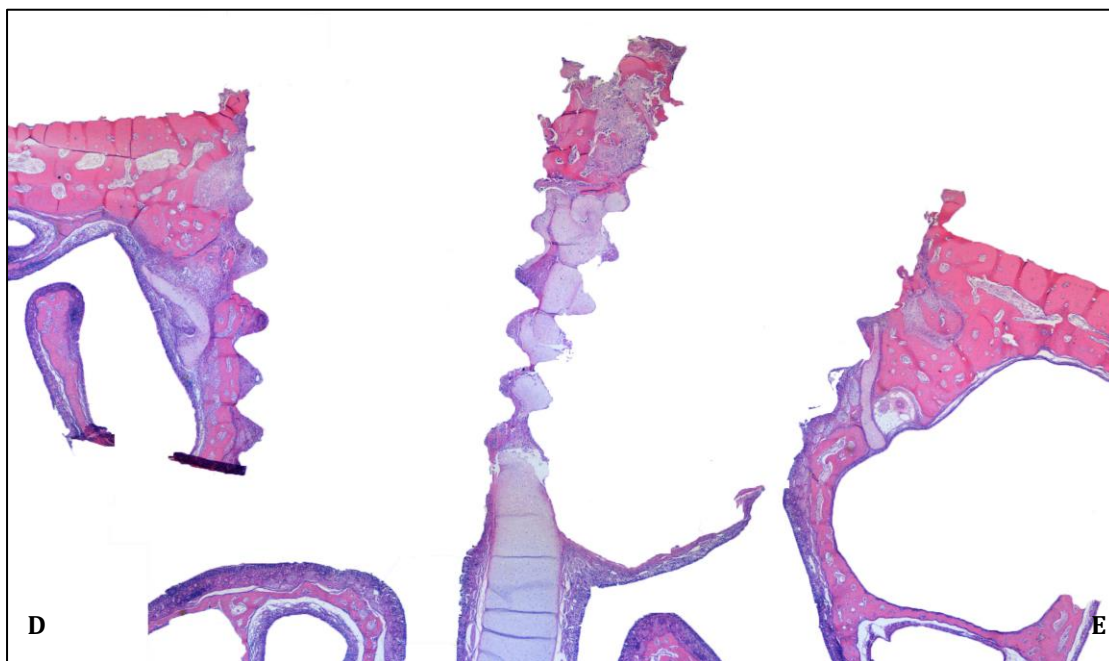


Fig. 26: Fotomicrografia da análise histológica para ELCOI entre os grupos TCP (D) e SBF (E) no período de 7 dias (HE, 0,8X).

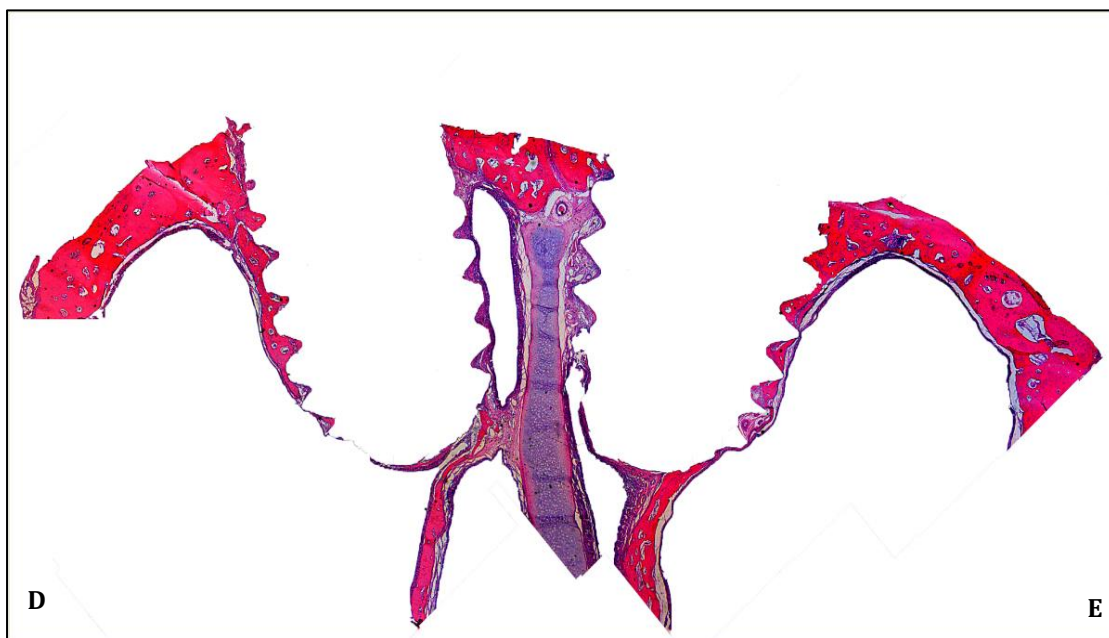


Fig. 27: Fotomicrografia da análise histológica para ELCOI entre os grupos TCP (D) e SBF (E) no período de 15 dias (HE, 0,8X).

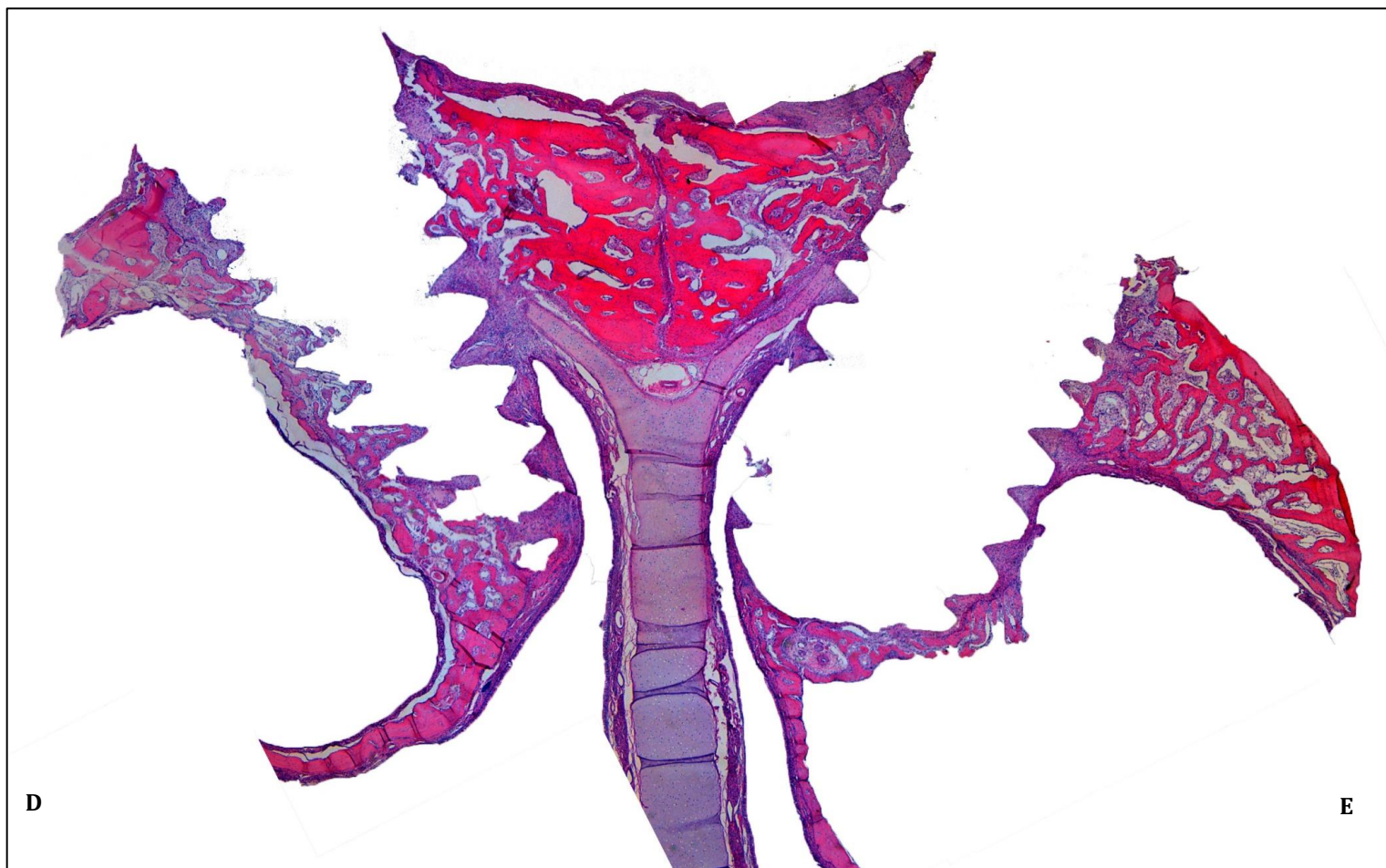
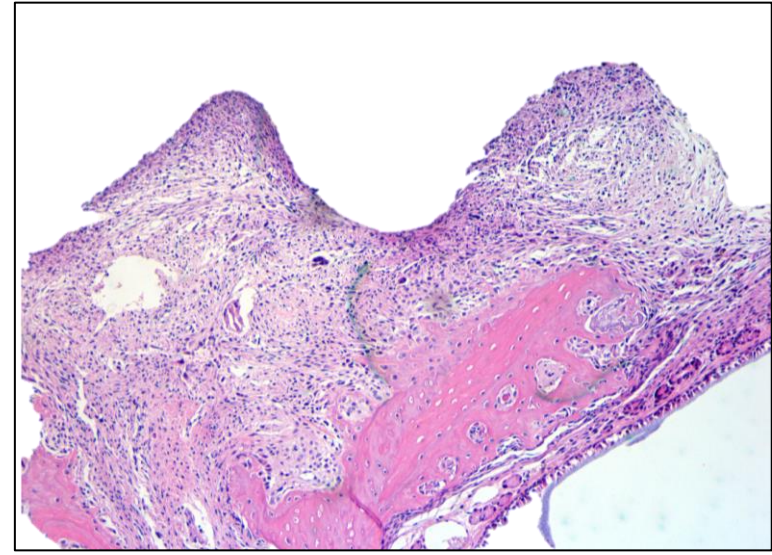
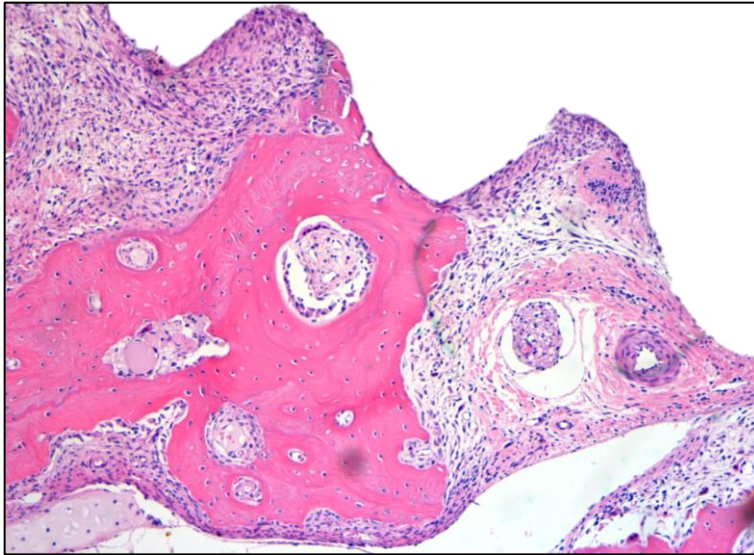


Fig. 28: Fotomicrografia da análise histológica para ELCOI entre os grupos TCP (D) e SBF (E) no período de 40 dias (HE, 0,8X).

TCP

SBF

15 dias



40 dias

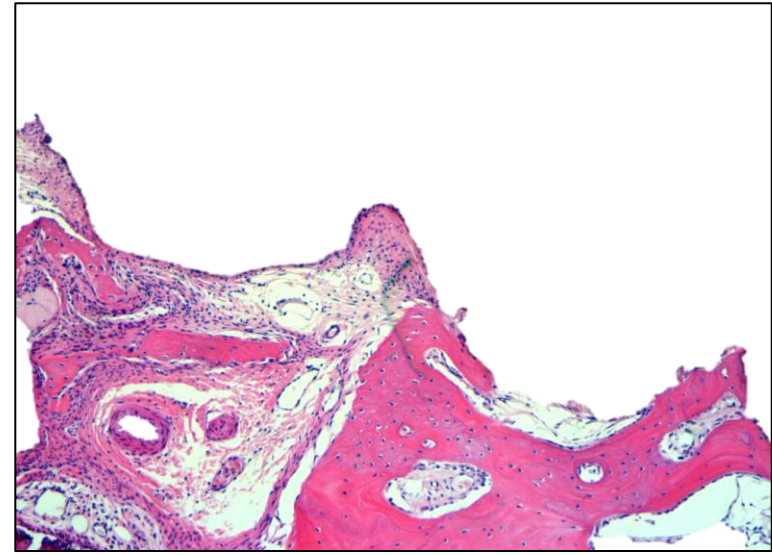
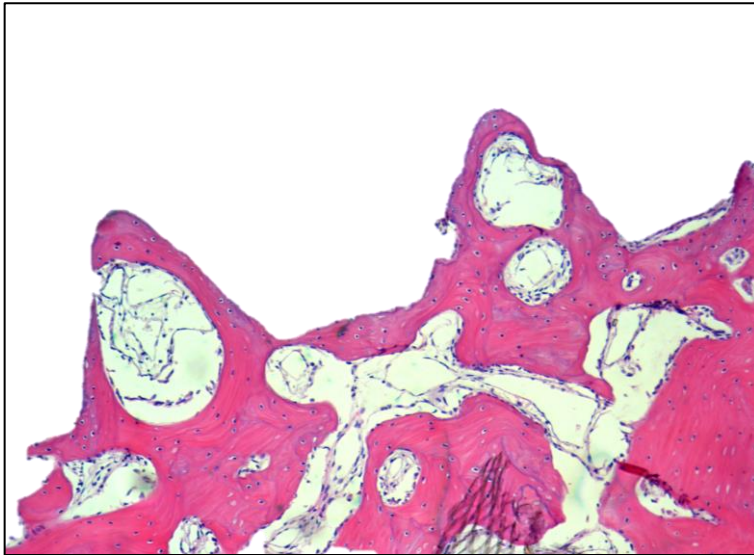


Fig. 29: Fotomicrografia da análise histológica para AON entre os grupos TCP (D) e SBF (E) nos períodos de 15 e 40 dias (HE, 10X).

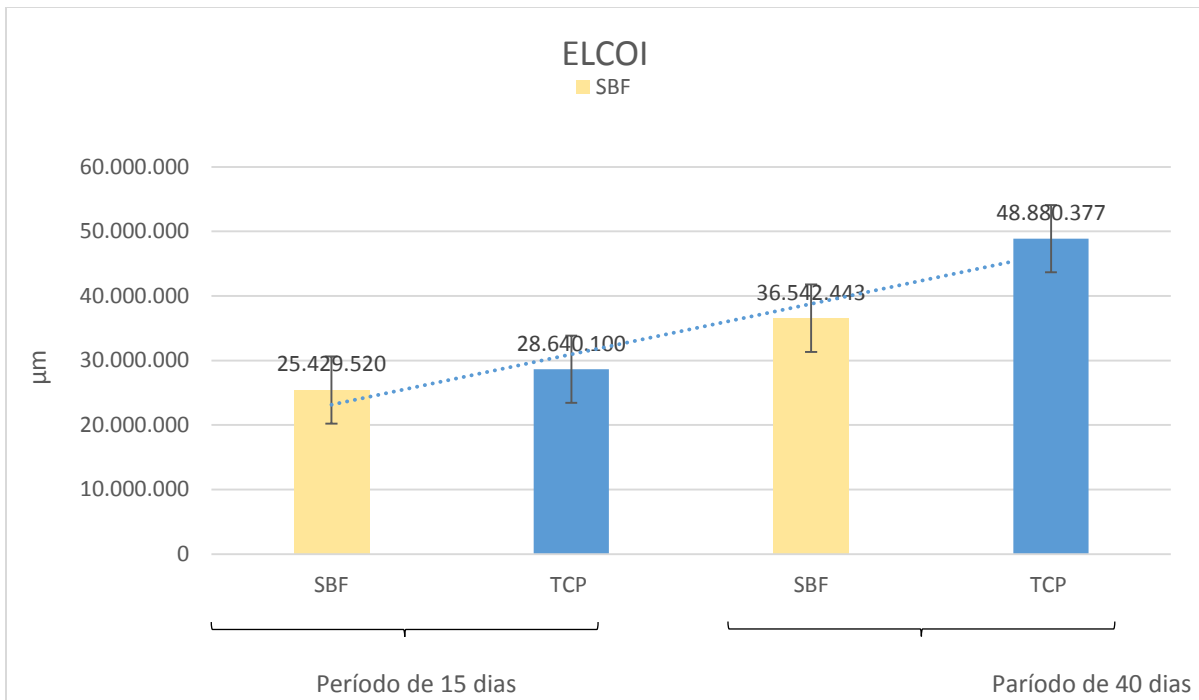


Fig. 30: Gráfico da ELCOI comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em μm das amostras aos 15 e 40 dias.

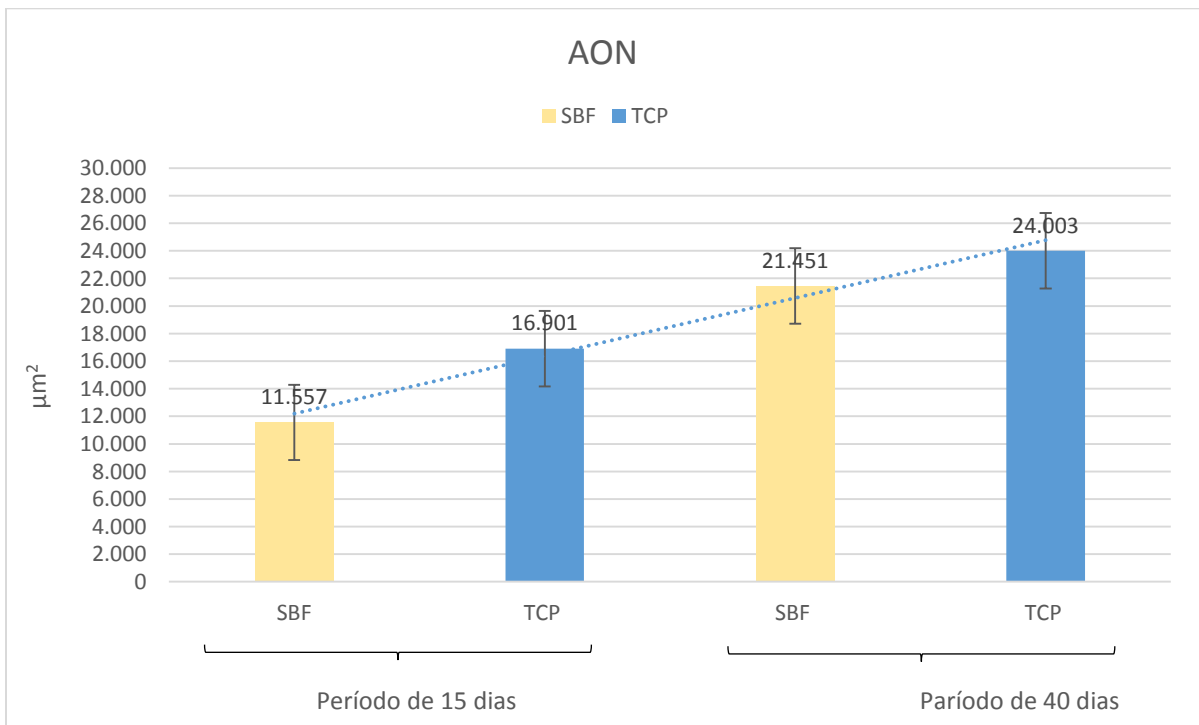


Fig. 31: Gráfico da AON comparando presença de tecido ósseo por meio das médias em μm^2 das amostras aos 15 e 40 dias

TABELAS

Tabela 1. Composição do plasma sanguíneo e da Solução modificada de fluido corporal (Simulated Blody Fluid- SBF) (mmol/dm³)

	Na⁺	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺	HCO₃²⁻	CL⁻	HP₄²⁻	so₄²⁻
Plasma sanguíneo	142.0	5.0	2.5	1.5	27.0	103.0	1.0	0.5
SBF	140.4	-	3.1	-	5.0	142.9	1.86	-

Tabela 2. Teste de Molhabilidade: Medida dos ângulos de contato da água, diiodometano e etilenoglicol nas superfícies dos implantes do grupo TCP.

Amostra TCP	Água $\theta(^{\circ})$	Diiodometano $\theta(^{\circ})$	Etilenoglicol $\theta(^{\circ})$
<i>Impl. 1 Cervical</i>	-	-	-
<i>Impl. 1 Médio</i>	-	-	-
<i>Impl. 1 Apical</i>	-	-	-
<i>Impl. 2 Cervical</i>	-	-	-
<i>Impl. 2 Médio</i>	-	-	-
<i>Impl. 2 Apical</i>	-	90,0	-

Tabela 3. Teste de Molhabilidade: Medida dos ângulos de contato da água, diiodometano e etilenoglicol nas superfícies dos implantes do grupo SBF.

Amostra SBF	Água $\theta(^{\circ})$	Diiodometano $\theta(^{\circ})$	Etilenoglicol $\theta(^{\circ})$
<i>Impl. 1 Cervical</i>	134	-	131,6
<i>Impl. 1 Médio</i>	115,4	-	124,6
<i>Impl. 1 Apical</i>	114,8	-	-
<i>Impl. 2 Cervical</i>	150,3	-	-
<i>Impl. 2 Médio</i>	151,6	-	-
<i>Impl. 2 Apical</i>	88,6	-	115,1

Tabela 4. Valores do quociente de estabilidade dos implantes (ISQ) por animal e grupos (N/cm) imediatamente após a instalação dos implantes.

Período imediato após a instalação dos implantes		
Espécimes	TCP	SBF
1	26	25
2	10	17
3	20	7
4	17	17
5	14	14
6	14	10
7	10	7
8	7	7
9	14	14
10	14	17
11	15	14
12	25	17
13	7	10
14	14	13
15	18	21
16	7	7
17	7	14
18	3	3
19	1	10
20	7	14

Tabela 5. Valores do quociente de estabilidade dos implantes (ISQ) por grupos no período de 7 dias (N/cm).

Período de 07 dias		
Espécimes	TCP	SBF
1	14	28
2	14	20
3	20	17
4	14	20
5	17	17
6	20	17

Tabela 6. Valores do quociente de estabilidade dos implantes (ISQ) por grupos no período de 15 dias (N/cm).

Período de 15 dias		
Espécimes	TCP	SBF
7	20	7
8	7	14
9	14	7
10	10	22
11	14	7
12	28	10

Tabela 7. Valores do quociente de estabilidade dos implantes (ISQ) por grupos no período de 40 dias (N/cm).

Período de 40 dias		
Espécimes	TCP	SBF
13	17	20
14	30	10
15	20	3
16	22	17
17	17	22
18	10	14

Tabela 8. Teste de análise de variância com parcelas subdivididas (ANOVA), obtendo os seguintes resultados para os valores de p ($p > 0,05$) do ISQ.

Período	Grupo	n	Media	Desvio Padrão	pBBF
ISQ inicial	TCP	18	10.164	6.208	0.818
	SBF	18	10.0541	5.625	
ISQ 7 dias	TCP	6	16.081	2.949	0.143
	SBF	6	19.219	4.262	
ISQ 15 dias	TCP	6	12.727	7.529	

	SBF	6	9.295	5.980	0.295
ISQ 40 dias	TCP	6	17.319	6.623	0.231
	SBF	6	9.104	7	

Tabela 9. Teste de análise de variação de Pearson (VP), obtendo os seguintes resultados para os valores de p ($p < 0,05$)* do ISQ:

Período	r Pearson	p
Inicial - TCP SBF	0.397	0.435
TCP Inicial – TCP 7 dias	-0.787	0.882
TCP Inicial – SBF 7 dias	0.677	0.139
TCP Inicial – TCP 15 dias	0.296	0.568
TCP Inicial – SBF 15 dias	-0.321	0.534
TCP Inicial – TCP 40 dias	-0.316	0.541
TCP Inicial – SBF 40 dias	0.129	0.807
SBF inicial – TCP 7 dias	-0.872	0.023*
SBF inicial – SBF 7 dias	0.909	0.011*
SBF inicial – TCP 15 dias	-0.135	0.798
SBF inicial – SBF 15 dias	0.154	0.770
SBF inicial – TCP 40 dias	0.225	0.667
SBF inicial – SBF 40 dias	0.626	0.183
TCP 7dias – SBF 7 dias	-0.676	0.14

TCP 7dias – TCP 15 dias	0.553	0.254
TCP 7dias – SBF 15 dias	-0.504	0.307
TCP 7dias – TCP 40 dias	-0.604	0.204
TCP 7 dias –TCP 15 dias	-0.455	0.364
SBF 7 dias – SBF 15 dias	0.046	0.929
SBF 7 dias – TCP 15 dias	-0.037	0.943
SBF 7 dias – TCP 40 dias	0.101	0.848
SBF 7 dias – SBF 40 dias	0.384	0.452
TCP 15 dias –SBF 15 dias	-0.464	0.353
TCP 15 dias –TCP 40 dias	-0.922	0.008*
TCP 15 dias –SBF 40 dias	0.185	0.724
SBF 15 dias – TCP 40 dias	0.437	0.385
SBF 15 dias – SBF 40 dias	0.041	0.938
TCP 40 dias – SBF 40 dias	-0.321	0.533

* Diferença estatisticamente significante $p < 0,05$.

Tabela 10: Valores da análise morfométrica da formação óssea nas microtomografias dos grupos TCP e BTC, no período de 15 dias.

15 DIAS	ESPÉCIME 1		ESPÉCIME 2	
	TCP	SBF	TCP	SBF
Bone volume (BV)	0.19341mm ³	0.13199mm ³	0.14606mm ³	0.05271mm ³
Percent Bone volume % (BV/TV)	27.38756%	24.97791%	22.02866%	7.51057%
Trabecular Thickness (Tb. Th)	0.09369mm	0.08947mm	0.07207mm	0.03245mm
Trabecular Number (Tb. n)	2.92320mm	2.79188mm	3.05646mm	2.31440mm
Trabecular separation (Tb. Sp)	0.17032mm	0.18706mm	0.21159mm	0.26464mm
Total Porosity % (Po.tot)	72.61244%	75.02209%	77.97134%	92.48943%

Tabela 11: Valores da análise morfométrica da formação óssea nas microtomografias dos grupos TCP e BTC, no período de 40 dias.

40 DIAS	ESPÉCIME 1		ESPÉCIME 2	
	TCP	SBF	TCP	SBF
Bone volume (BV)	0.21761mm ³	0.27870mm ³	0.27566mm ³	0.24016mm ³
Percent Bone volume % (BV/TV)	38.95360%	53.09873%	46.86579%	42.41064%
Trabecular Thickness (Tb. Th)	0.10576mm	0.09682mm	0.10916mm	0.10470mm
Trabecular Number (Tb. n)	3.68323mm	5.48449mm	4.29318mm	4.05057mm
Trabecular separation (Tb. Sp)	0.19502mm	0.08180mm	0.21769mm	0.19457mm
Total Porosity % (Po.tot)	61.04640%	46.90127%	53.13421%	57.58936%

Tabela 12. Teste da ANOVA referentes aos valores de BV, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):

Período	P
SBF 15 vs. SBF 40	0,0003*
SBF 15 vs. TCP 15	0,2042
SBF 15 vs. TCP 40	0,0007*
SBF 40 vs. TCP 15	0,0036*
SBF 40 vs. TCP 40	0,8767
TCP 15 vs. TCP 40	0,0090*

* Diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Tabela 13. Teste da ANOVA referentes aos valores de BV/TV, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):

Período	p
SBF 15 vs. SBF 40	0,0006*
SBF 15 vs. TCP 15	0,3254
SBF 15 vs. TCP 40	0,0019*
SBF 40 vs. TCP 15	0,0046*
SBF 40 vs. TCP 40	0,7267
TCP 15 vs. TCP 40	0,0179*

* Diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Tabela 14. Teste da ANOVA referentes aos valores de Tb.th, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):

Período	P
SBF 15 vs. SBF 40	0,0526
SBF 15 vs. TCP 15	0,3636
SBF 15 vs. TCP 40	0,0250*
SBF 40 vs. TCP 15	0,5209
SBF 40 vs. TCP 40	0,9485
TCP 15 vs. TCP 40	0,2796

* Diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Tabela 15. Teste da ANOVA referentes aos valores de Tb.N, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):

Período	p
SBF 15 vs. SBF 40	0,0007*
SBF 15 vs. TCP 15	0,5831
SBF 15 vs. TCP 40	0,0112*
SBF 40 vs. TCP 15	0,0031*
SBF 40 vs. TCP 40	0,1689
TCP 15 vs. TCP 40	0,0674

* Diferença estatisticamente significante $p < 0,05$.

Tabela 16. Teste da ANOVA referentes aos valores de Tb.Sp, obtendo os seguintes resultados valores de p(Turkey):

Período	p
SBF 15 vs. SBF 40	0,0697
SBF 15 vs. TCP 15	0,6543
SBF 15 vs. TCP 40	0,9092
SBF 40 vs. TCP 15	0,3456
SBF 40 vs. TCP 40	0,1754
TCP 15 vs. TCP 40	0,9516

* Diferença estatisticamente significante $p < 0,05$.

Tabela 17. Teste da ANOVA referentes aos valores de Po.Tot, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):

Período	p
SBF 15 vs. SBF 40	0,0006*
SBF 15 vs. TCP 15	0,3254
SBF 15 vs. TCP 40	0,0019*
SBF 40 vs. TCP 15	0,0046*
SBF 40 vs. TCP 40	0,7267
TCP 15 vs. TCP 40	0,0179*

* Diferença estatisticamente significante $p < 0,05$.

Tabela 18: Análise de imunoistoquímica com os scores referentes a marcação para a osteocalcina, nos grupos TCP e SBF, no período de 40 dias.

OSTEOCALCINA	
TCP	SBF
1 a 2	1
1	1
2	1

Tabela 19: Análise de imunoistoquímica com os scores referentes a marcação para a TRAP, nos grupos TCP e SBF, no período de 40 dias.

TRAP	
TCP	SBF
1	1
1	1
2	2

Tabela 20. Teste de Kruskal-Wallis referentes aos valores da ELCOI, obtendo os seguintes resultados valores de p (Dunn):

Período	p
SBF 15 vs. SBF 40	0,9999
SBF 15 vs. TCP 15	0,9999
SBF 15 vs. TCP 40	0,3179
SBF 40 vs. TCP 15	0,9999
SBF 40 vs. TCP 40	0,9999
TCP 15 vs. TCP 40	0,8197

Tabela 21. Teste da ANOVA referentes aos valores da AON, obtendo os seguintes resultados valores de p (Turkey):

Período	p
SBF 15 vs. SBF 40	0,5948
SBF 15 vs. TCP 15	0,8995
SBF 15 vs. TCP 40	0,4128
SBF 40 vs. TCP 15	0,9344
SBF 40 vs. TCP 40	0,9871
T.C. 15 vs. TCP 40	0,7975