

**WILLIAM PHILLIP PEREIRA DA SILVA**

**CULTURA DE CÉLULAS OSTEOGÊNICAS  
PRIMÁRIAS A PARTIR DE OSSO DE BAIXA  
DENSIDADE E ANÁLISE DO REPARO ÓSSEO  
PERIIMPLANTAR EM RATAS  
OSTEOPORÓTICAS EM FUNÇÃO DA  
TEXTURIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE POR MEIO DA  
OXIDAÇÃO POR PLASMA ELETROLÍTICO**

**Araçatuba – SP**

**2019**

**WILLIAM PHILLIP PEREIRA DA SILVA**

**CULTURA DE CÉLULAS OSTEOGÊNICAS  
PRIMÁRIAS A PARTIR DE OSSO DE BAIXA  
DENSIDADE E ANÁLISE DO REPARO ÓSSEO  
PERIIMPLANTAR EM RATAS  
OSTEOPORÓTICAS EM FUNÇÃO DA  
TEXTURIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE POR MEIO DA  
OXIDAÇÃO POR PLASMA ELETROLÍTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial)

**Orientador:** Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Associada Roberta Okamoto

**Araçatuba – SP**

**2019**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586c Silva, William Phillip Pereira da.  
Cultura de células osteogênicas primárias a partir de osso de baixa densidade e análise do reparo ósseo periimplantar em ratas osteoporóticas em função da texturização de superfície por meio da oxidação por plasma eletrolítico / William Phillip Pereira da Silva. – Araçatuba, 2018  
122 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani  
Coorientadora: Profa. Roberta Okamoto

1. Oxidação 2. Osteoporose 3. Cultura primária de células 4. Células mesenquimais estromais 5. Implantes dentários  
I. T.

Black D7  
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550



# *Dedicatória*





edico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida:

**A** minha mãe, **Roseana Miriam Pereira da Silva**, a quem dedico todo meu amor e carinho. Mãe, a senhora é o meu porto seguro, o qual encontro forças para continuar diante as dificuldades e encontro a beleza mais pura da vida em momentos de alegria. Sem o seu suporte tudo ficaria mais difícil, a cada momento de minha vida tive seu amor presente. É impossível transcrever e agradecer toda sua dedicação, carinho e amor para com todos, a senhora é o meu grande exemplo para me tornar uma pessoa mais compreensiva, paciente, carinhosa e amorosa. Sua participação nesta conquista, mesmo de longe foi fundamental, meu agradecimento e amor por você, é eterno!

**Ao** meu amado pai, **Acir Pereira da Silva**, meu grande exemplo e herói. Todas suas histórias de sua trajetória na vida acadêmica e profissional, sem sombras de dúvidas me incentivam a minha dedicação, amor com o próximo, ser justo, honesto e humilde. Independente do lugar aonde eu esteja, sei que posso contar com seu apoio. Obrigado por todos os ensinamentos, todo o carinho e amor, obrigado por sempre acreditar no meu potencial e me fazer sempre ir além, sem isso, nada disso seria possível.

**Ao** meu irmão, **Jefferson Paolo Pereira da Silva**, mesmo longe um do outro, sei que posso contar com você em todos os momentos. Sempre tive em você minha grande inspiração e referência em minha vida. Sou eternamente grato pelo seu companheirismo, amor e por ser esta pessoa a quem considero muito mais que um irmão. Te amo eternamente!

**Ao** meu irmão, **Edward Henrique Pereira da Silva**, meu grande amigo, colega de profissão, meu irmãozinho. Obrigado por todo apoio e amparo que sempre que me deu. Obrigado por ser minha calma, meu centro de equilíbrio e sempre "recarregar" minhas energias. Desde sempre você está comigo em todos meus passos na vida acadêmica e profissional, tenho muito orgulho de poder dividir essa parte da vida ao seu lado e sem dúvidas, esse título tem muita participação sua. Obrigado por todo carinho, amor e zelo que sempre teve por mim. Te amo para sempre!

*Agradecimentos  
especiais*

---

---

**A** Deus, obrigado por me abençoar e iluminar a cada passo, por conceder

oportunidades de vivenciar todo seu amor em cada momento de minha vida. Obrigado por me ajudar a superar os momentos de dificuldades e mostrar sempre o melhor caminho. Obrigado, meu Deus, por nunca me abandonar e permitir que meu caminho nessa jornada eu possa contar com todo seu amor.

**Ao Dr. Leocádio José Correia**, meu guia espiritual e amigo, que em muitos momentos de minha vida esteve ao meu lado, com seu suporte de amor e carinho, me orientando e curando. Meu grande exemplo de moralidade, espiritualidade, amor e dedicação ao próximo. Agradeço a Deus sempre por permitir conversar e trabalhar ao seu lado.

**Ao** meu querido orientador e amigo **Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani**, desde nossa primeira conversa, o carinho e o acolhimento que recebi, permanece até hoje. Agradeço muito a Deus, por permitir aprender com uma pessoa tão maravilhosa como você. Minha vida mudou muito após entrar na Pós-Graduação, obrigado por todo o aprendizado que obtive nesses anos ao seu lado, não somente acadêmico, mas como ser humano, e principalmente esse seu sentimento que nos transmite de ser um grande cirurgião e professor, que ama a profissão e nos contagia. Obrigado por tudo que pôde fazer por mim durante esses dois anos, obrigado pelo companheirismo e carinho. Tenho muito orgulho em ser seu primeiro orientado, e saiba que estarei presente e trabalhando ao seu lado por muitos e muitos anos.

**A** minha querida coorientadora, **Prof.ª Associada Roberta Okamoto**, além da senhora ser uma grande fonte de conhecimento e inspiração, é um exemplo na humildade e compaixão. Sua atenção especial para com o aluno é contagiante e saiba que tenho profunda admiração pela senhora. Obrigado por estar sempre presente e disponível, transmitindo muito carinho e conhecimento.

**Aos** Professores da Disciplina da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial **Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, Osvaldo Magro Filho, Alessandra Marcondes**

**Aranega, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi e Francisley Ávila Souza**, pelo carinho, coleguismo, auxílio, exemplo e amizade desfrutada em nosso departamento. Recebam o meu carinho e admiração.

**Ao** meu grande amigo **Gustavo Antônio Correia Momesso**, obrigado pela sua amizade verdadeira, por sua dedicação de tempo me ensinando e ao mesmo tempo nos divertindo. A capacidade de rir e aprender ao mesmo tempo, nos proporcionou muitas ideias, pesquisas e principalmente momentos alegres, que torna essa jornada muito mais leve. Desde que iniciei esta jornada você se mostrou uma pessoa diferenciada, companheira de longas horas no departamento, se tornou um anjo em minha vida, com uma parceria e amizade deslumbrante. Saiba que além de amigos, você se tornou um grande irmão, sem suas ajudas e seus conhecimentos, nada disso poderia ser realizado.

**Ao** meu grande amigo **Tárik Ocon Braga Polo**, você foi uma pessoa muito importante nesta jornada, ensinando cada passo novo com uma simplicidade, dedicação e um jeito único, tenho uma grande admiração por você. Muito além de uma fonte de inspiração, você se tornou um grande amigo, agradeço por todo o suporte.

**A** minha amiga e namorada **Kátia Gonçalves de Jesus**, muito obrigado pela sua amizade, carinho e amor. Sem sua ajuda e suporte, nas diversas formas, esse momento não seria possível. Nosso relacionamento iniciou com uma amizade em um momento tumultuado de nossas vidas, no qual foi fundamental para se tornar algo único. Você é uma pessoa iluminada e extremamente especial, que com seu jeito único em rir e me aguentar, tornar minha vida mais leve. Obrigado por estar ao meu lado, amo você.

**Aos** meus amigos **Ciro Borges Duailibe de Deus, André Hergesel de Oliva, Thiago Machado, Pier Paolo Polli e Felipe Gatto**, muito obrigado pela sua amizade além da faculdade, foram fundamentais desde minha chegada em Araçatuba. Sempre levarei a amizade de vocês e os momentos únicos para toda eternidade.

**Ao** meu amigo, **Fernando Makoto Kutsunugi de Carvalho**, obrigado por sempre me ajudar em todos momentos, você é uma pessoa que teve um papel muito importante nessa



minha trajetória, com seu auxílio, tornou a distância de Curitiba – Araçatuba menor, você é um grande irmão e companheiro de profissão.

**A**os meus amigos de longas datas, **João Paulo da Silva Jungles dos Santos, Endrigo da Silva Jungles dos Santos, Moisés Alves Guergolet, Lucas Foltz, Gabrieli Endres, Robson Fernando dos Santos, Fabiane Ravaglio de Oliveira**, obrigado por sempre estarem ao meu lado, mais que amigos, somos uma família, a qual a distância e o tempo nunca nos impedem de estarmos juntos. Obrigado por todo o apoio e carinho hoje e sempre.

**A** minha **família Pereira da Silva e família Schirmer**, minha base de tudo, cada um tem meu amor e meu agradecimento por estarem ao meu lado nessa conquista.

**A**os meus padrinhos e tios, **Nilza Maria Pereira da Silva e Carlos Francisco Costa** obrigado pelo amor e apoio de vocês, meus “segundos pais”, essa conquista não seria possível sem vocês.

**A**o meu amigo e chefe, **Dr. José Luis Dissenha**, obrigado por sempre me ajudar em todos momentos, sem você, nada disso teria acontecido. Lembro-me bem a primeira vez que conversamos, eu perguntando sobre como fazer estágio no hospital. Após isso, você se tornou um “Pai” na cirurgia, me ensinando tudo que sei hoje, não somente na profissão. Obrigado por nunca desistir de me ensinar e sempre estar ao meu lado.

**A**o meu amigo e chefe, **Dr. Laurindo Moacir Sassi**, agradeço imensamente por tudo o que o sr. fez e ainda faz por mim, todos seus ensinamentos e conselhos desde a época de estagiário, a época de residente e até agora como colega. Obrigado por sempre me ajudar em todos momentos e ser essa fonte de inspiração.

**A** minha grande amiga **Bruna da Fonseca Wastner**, muito obrigado por todos os momentos ao meu lado, sem sua amizade e companheirismo, muitas coisas em minha vida não teriam sentido. Você é sem sombra de dúvidas uma verdadeira fonte de

inspiração, a qual me abriu os olhos para diversos mundos. Obrigado pela amizade e ensinamentos.

**Aos alunos de iniciação científica João Mateus Fonseca e Santos, Stefany Barbosa, Pedro Augusto Araújo Soares e Mônica Caroline de Souza,** pela disponibilidade e ajuda imprescindível que exercem na realização de todos os projetos. Sem o comprometimento e força de vontade de vocês, nada disso seria possível. Recebam minha gratidão.

**Aos funcionários da Universidade Marco Aurélio de Oliveira Ianner, Renato Gomes de Oliveira, Paulo Roberto Gratão e Fausto Daniel de Oliveira Canuto,** por todos os ensinamentos, pela disponibilidade, ajuda exercem na realização de todos os projetos. Sem os seus ensinamentos, nada disso seria possível. Recebam minha gratidão.

**Aos meus amigos da USP – Ribeirão Preto, Gileade Pereira Freitas e Helena Bacha Lopes.** Obrigado pela atenção, carinho e disponibilidade que tiveram comigo, seus ensinamentos foram fundamentais, esse trabalho sem vocês não teria saído. Obrigado por serem grandes professores e principalmente por se tornarem grandes amigos.

**Aos colegas da pós-graduação da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (Cecilia Alves de Souza, Hiskell Francine Fernandes e Oliveira, Erik Neiva Ribeiro Carvalho Reis, João Paulo Bonardi, Valthierre Nunes Lima, Pedro Henrique da Silva Gomes Ferreira, Fábio Batista, Gabriel Mulinari, Paulo Zupelari, Jonathan Ribeiro, André Fabris da Silva “Andrezinho”, Cassio Messias Beija-Flor Figueiredo, Luara Colombo, Lara Cervantes, Henrique Haddad, Bruno Coelho Mendes, Rodrigo Capalbo, Raquel Barroso Parra da Silva, Guilherme Andre Del’Arco Ramires, Lais Sara Hegas, , Fábio Vieira, Ana Flávia Piquera Santos, Carol Chapernet e Bruna Junger).** Aprendi muito a cada momento com cada um de vocês. Obrigado pelo auxílio constante na minha vida e na pós-graduação.



# *Agradecimientos*



**À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa do diretor **Prof. Titular Wilson Roberto Poi** pela oportunidade de realização do curso Mestrado. Devo tudo o que conquistei, principalmente, a esta universidade que me proporcionou os melhores ensinamentos, professores e estrutura que poderia ter. Sou eternamente grato à FOA-UNESP.

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

**Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Valéria de Queiroz M. Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos, Lilian Sayuri Mada**, pela disponibilidade e paciência em todas as etapas do mestrado. Pelo trabalho honesto e sempre ágil.

**Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** pela prontidão em nos atender e carinho.

**Ao Laboratório e grupo de pesquisa da professora Roberta Okamoto**, com especialidade para as alunas de iniciação científica que sempre nos ajudaram nas análises dos tecidos descalcificados. Fica nossa gratidão.

**Aos meus professores e colegas do Hospital Erasto Gaertner, Dr. Fernando Luiz Zanferrari, Maria Isabela Guebur, Roberta Targa Stramandinolli-Zanicotti, Juliana Lucena Schussel**, agradeço imensamente por todos ensinamentos e amizade, ao longo de todos esses anos. Obrigado pelo apoio e incentivo a sempre ser uma pessoa e um profissional melhor

**Ao grupo de pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP**, sob a coordenação do **Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa**, incluindo os técnicos **Roger Rodrigues Fernandes e Fabiola Singaretti de Oliveira**, pela auxílio e ensinamentos com todas as análises de cultura celular.

**Ao** grupo de pesquisa da **Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp**, sob a liderança do professor **Valentim Adelino Ricardo Barão**, incluindo o doutorando **Jairo Cordeiro e Bruna Ergumi**, pelo auxílio em todo o desenvolvimento deste trabalho.

**Ao** Laboratório de Plasmas Tecnológicos da Faculdade de Engenharia de Sorocaba – Unesp, na pessoa do professor **Nilson Cruz** e sua esposa professora **Liliane**, que juntamente com os funcionários e pós-graduandos do laboratório permitiu grande parte das análises in vitro bem como a técnica para texturização de superfície por PEO.

**Ao** Laboratório de Tecidos calcificados – EXAKT da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAR – UNESP, na pessoa do seu responsável, o professor **Élcio Marcantônio Júnior**, sua esposa, a professora **Adriana Marcantônio** e os demais professores da disciplina de Periodontia pela recepção e facilitação durante as inúmeras vezes que viajamos a Araraquara para realizar as análises dos cortes calcificados. Com especialidade, agradecemos a técnica **Ana Cláudia**, que sempre nos auxiliou e orientou. Sem a sua atenção, não teríamos conseguido êxito com este trabalho e tantos outros que estão em desenvolvimento. Nossa eterna gratidão e receba nosso carinho neste momento.

**A** Empresa de Implantes Odontológicos **Emfils**, na pessoa do **Fábio Colhado Embacher** pelo fornecimento de todos os discos e implantes para a realização desta pesquisa. Sempre com muita presteza e agilidade com os nossos pedidos.

**Aos pacientes**, pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas e, como sempre estaremos em nossas vidas, aprendendo constantemente. Minha eterna gratidão.

**Aos** nossos queridos **Animais “in memoriam”**, obrigado por doar o bem mais importante, a vida, por uma causa nobre. Minha eterna gratidão e carinho.

**À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da Bolsa de Mestrado durante todo o período do curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro durante o primeiro ano de curso e com isso, permitir que fosse possível a realização do mestrado.

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro a esta pesquisa ligada ao auxílio regular em pesquisa do orientador (processo número 2016/20297-6).

## Epígrafe

*“ Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vive-la como se os milagres não existissem. A segunda é vive-la como se tudo fosse milagre”.*

(Albert Einstein)

**Silva WPP. Cultura de células osteogênicas primárias a partir de osso de baixa densidade e análise do reparo ósseo periimplantar em ratas osteoporóticas em função da texturização de superfície por meio da oxidação por plasma eletrolítico [dissertação]. Araçatuba: UNESP - Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2019**

## **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar um novo método de texturização por PEO com incorporação de Ca e P na superfície do Ti-6Al-4V em ossos de baixa densidade, por meio de avaliação *in vitro*, *ex-in vivo* e *in vivo*, em função de parâmetros topográficos e reparacionais. 57 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), sendo 38 ratas com 6 meses de idade (Grupos OXV - submetidas à ovariectomia e SHAM - cirurgia fictícia) e 19 ratas senis (18 meses de idade: Grupo SENIL), foram divididas para realização do estudo *ex-in vivo* (n=9) e *in vivo* (n=48). Os grupos para análise *ex-in vivo* foram submetidos à eutanásia e os fêmures foram removidos e transportados em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa ( $\alpha$ - MEM) suplementado com 500  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina e 3  $\mu\text{g/mL}$  de fungisona. As células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTMs-MO) dos fêmures, foram isoladas e cultivadas em meio de crescimento para manterem-se como CTMs. Após alcançar a subconfluência, as células foram cultivadas em 3 superfícies de discos de Ti-6Al-4V, grupo CONTROLE (superfície usinada) grupo AC (superfície tratada por Ataque Ácido e Jateamento) e grupo PEO (superfície tratada por Oxidação de Plasma Eletrolítico com associação de Cálcio e Fosforo). Para avaliação das respostas celulares foram realizados ensaios de viabilidade celular, expressão gênica de marcadores osteoblásticos, imunolocalização de sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN), atividade da fosfatase alcalina (ALP) e formação de matriz mineralizada. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA 1 fator ou Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Nos experimentos *in vivo*, após 90 dias, foi instalado um implante em cada tíbia, sendo um implante pertencente ao grupo PEO e o outro implante do grupo AC. Após 42 dias da instalação dos implantes, 8 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia e suas tíbias passaram pela descalcificação, para a análise histológica e imunoistoquímica (OPG, RANKL, OC e TRAP). As demais ratas, após a eutanásia, tiveram suas tíbias coletadas e analisadas em microtomografia computadorizada (BV.TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e Po(tot)) e, em seguida os implantes submetidos ao torque reverso em torquímetro digital (N.cm). A outra metade das tíbias foram processadas com inclusão em resina fotopolimerizadas para cortes calcificados e assim, a análise por microscopia confocal (calceína e alizarina) e em seguida, análise histométrica. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA 1 fator ou Kruskal-Wallis, seguido de pós teste Tukey;  $p < 0,05$ ). A análise da viabilidade celular mostrou que em todos os grupos testes de CTMs-MO



para SHAM, OVX e SENIL apresentaram um crescimento progressivo nos diferentes tempos de 3, 7 e 10 dias. Avaliação da expressão gênica através dos genes Runx2, SP7/Osterix, ALP, BSP, OC e OPN e análise pela imunofluorescência apresentaram uma leve tendência de melhores respostas nas CTMs-MO SHAM para o grupo AC, CTMs-MO OVX para o grupo PEO e CTMs-MO SENIS características semelhantes nos grupos AC e PEO. A atividade da fosfatase alcalina ocorreu maior expressão na superfície PEO no grupo SHAM, maior expressão na superfície CONTROLE no grupo OVX e no grupo SENIL houve um equilíbrio em todas as superfícies. A superfície PEO apresentou maior formação de nódulos de mineralização (21º dia) em todos os grupos. Nos experimentos *in vivo*, as análises histológicas mostrou maior neoformação óssea no grupo PEO quando comparado ao grupo AC nos grupos SHAM e OVX, e no grupo SENIL foram similares os resultados. A avaliação imunoistoquímica demonstrou um equilíbrio em todos os grupos na comparação de superfícies na proteína TRAP, para o processo de remodelação (OPG e RANKL) e mineralização (OC) nos grupos SHAM e SENIL ( $p>0,05$ ), ocorrendo uma diminuição no grupo OVX, no qual os resultados do PEO foram mais favoráveis que AC nessa conformação. Na análise microtomográfica, BV.TV os resultados foram semelhantes em ambos os grupos, porém em OVX AC mostrou menor porcentagem de volume ósseo e uma maior porosidade (Po(tot)). A análise biomecânica por torque-reverso (N.cm) mostrou que os maiores valores pertenciam ao grupo PEO. A dinâmica do tecido ósseo representada pelo *turnover* ósseo, observado através dos fluorocromos (Calceína e Alizarina) mostrou-se similares nos grupos experimentais. As superfícies PEO E AC nesse estudo demonstram que possuem uma grande capacidade de promoção da formação óssea independente dos tipos ósseos experimentais (SHAM, OVX e SENIL), tanto na área de contato osso e implante (ELCOI), quanto para a área de osso neoformado (AON). Diante das limitações do estudo *in vitro e in vivo*, os resultados foram esclarecedores para acreditar que o método de texturização aqui testado, por meio da Oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO), favoreceu à formação óssea, principalmente nos ossos mais críticos (OVX), inclusive evidenciando maior maturação óssea nos períodos mais tardios aqui analisados.

**Palavras chave:** Oxidação; Osteoporose; Cultura primária de células; Células mesenquimais estromais; Implantes dentários.

**Silva WPP. Primary cell culture from low-density bone and analysis periimplantar bone repair in osteoporotic rats as a function of surface texturing by electrolytic plasma oxidation [dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2019.**

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate a new PEO texturing method with Ca and P incorporation on the Ti-6Al-4V surface in low bone density, by means of in vitro, ex vivo and in vivo evaluation through topographic and repairment parameters. 57 Wistar rats (*Rattus norvegicus*), being 38 at 6 months of age (OVX Groups - submitted to ovariectomy and SHAM surgery) and 19 senile rats (18 months of age: SENIL Group) were divided into three subgroups: ex-in vivo (n = 9) and in vivo (n = 48). The Groups for ex-in vivo analysis were euthanized and femurs were removed and transported in culture medium containing minimal alpha modification ( $\alpha$ - MEM) medium supplemented with 500  $\mu$ g / ml gentamicin and 3  $\mu$ g / ml fungizone. The mesenchymal stem cells from bone marrow (MSC-M) of the femur were isolated and cultured in growth medium to remain as MSCs. After reaching the subconfluence, the cells were grown on 3 surfaces of Ti-6Al-4V discs, CONTROL group (machined surface) group AC (surface treated by etched-acid) and PEO group (surface treated by Electrolytic Plasma Oxidation with the association of Calcium and Phosphorus). Cell viability assays, gene expression of osteoblastic markers, bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN), alkaline phosphatase (ALP) activity, and mineralized matrix formation were performed to evaluate cellular responses. Data were submitted to ANOVA 1 factor test or Kruskal-Wallis test ( $P < 0.05$ ). In the groups for the in vivo study, after 90 days, an implant was installed on each tibia, one implant to the PEO group and another implant of the AC group. After 42 days of implant implantation, eight animals from each group underwent euthanasia and their tibiae underwent decalcification for histological and immunohistochemical analysis (OPG, RANKL, OC, and TRAP). The other rats, after euthanasia, had their tibiae collected and analyzed in computerized microtomography (BV.TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp and Po (tot)), and then implants submitted to reverse torque in Digital torque wrench (N.cm). Another half of the tibiae were processed with inclusion in photopolymerized resin for calcified cuts and thus the analysis by confocal microscopy (calcein and alizarin) and then histometric analysis. Data were submitted to 1-factor ANOVA or Kruskal-Wallis test, followed by Tukey test;  $p < 0.05$ ). The cell viability analysis showed that in all groups, MOH tests for SHAM, OVX, and SENIL showed a progressive growth in the different times of 3, 7 and 10 days. Evaluation of gene expression through the Runx2, SP7 / Osterix, ALP, BSP, OC and OPN genes and immunofluorescence analysis showed a slight tendency for better responses in the CTMs-

MO SHAM for the AC group, CTMs-MO OVX for the PEO group and CTMs-MO SENIL features similar in AC and PEO groups. The alkaline phosphatase activity was higher on the PEO surface in the SHAM group, the greater expression on the CONTROL surface in the OVX group and the SENIL group showed a balance on all surfaces. The PEO surface presented a higher formation of mineralization nodules in all groups (21st day). For the in vivo analyzes, the histological analysis showed greater bone neoformation in the PEO group when compared to the AC group in the SHAM and OVX groups, and in the SENIL group, the results were similar. The immunohistochemical evaluation showed a balance in all groups in the comparison of surfaces in the TRAP protein, for the remodeling process (OPG and RANKL) and mineralization (OC) in the SHAM and SENIL groups ( $p > 0.05$ ). OVX group, in which PEO results were more favorable than AC in this confirmation. In the microtomographic analysis, BV.TV the results were similar in both groups, but in OVX AC showed a lower percentage of bone volume and a higher porosity (Po (tot)). Biomechanical analysis by torque-reverse (N.cm) showed that the highest values belonged to the PEO group. The dynamics of the bone tissue represented by the bone turnover observed through the fluorochromes (Calcein and Alizarin) were similar in the experimental groups. The PEO and AC surfaces in this study demonstrate that they have a great ability to promote bone formation independent of experimental bone types (SHAM, OVX, and SENIL), both in the area of bone and implant contact (ELCOI) and in the area of newly formed bone (AON). Considering the limitations of the in vitro and in vivo study, the results were enlightening to believe that the texturing method tested here, through Electrolytic Plasma Oxidation (PEO), favored bone formation, mainly in the most critical bones (OVX), including evidence of increased bone maturation in the later periods analyzed here.

***Keywords:*** Oxidation; Osteoporosis; Primary cell culture; Stromal mesenchymal cells; Dental implants.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras .....	221
Lista de Abreviaturas.....	27
1. Introdução.....	29
2. Objetivos.....	32
3. Materiais e métodos.....	33
3.1. Estudo in vitro .....	34
Caracterização estrutural baseline .....	34
Texturização de superfície através da oxidação por plasma eletrolítico .....	34
Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	36
Energia livre de superfície e ângulo de contato.....	36
Perfilometria (Rugosidade de superfície) .....	37
3.2. Estudo Animal (ex-in vivo e in vivo).....	37
Comitê de Ética .....	37
Indução de osteoporose .....	38
Imunoensaio para dosagem de estrógeno .....	40
3.2.1 Estudo ex-in vivo.....	40
Isolamento e cultura de células.....	40
Plaqueamento das células sobre os discos de Titânio .....	41
Crescimento e Viabilidade Celular.....	42
Análise por PCR em tempo real .....	43
Análise por imunofluorescência .....	44
Atividade da Fosfatase Alcalina.....	45
Análise da formação de osso mineralizado semelhante a nódulos.....	46
Análise Estatística .....	47
3.2.2 Estudo in-vivo .....	47
Instalação de implantes.....	47
Análises do reparo ósseo periimplantar.....	49
Processamento laboratorial para tecidos descalcificados .....	49
Análise histológica .....	49
Imunoistoquímica .....	49
Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct).....	50
Teste biomecânico dos implantes (contra-torque).....	52
Análise Estatística .....	56
4. Resultados.....	57

4.1 Estudo in vitro .....	58
Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	58
Energia livre de superfície e ângulo de contato.....	65
Perfilometria (Rugosidade de superfície).....	66
4.2 Imunoensaio para dosagem de estrógeno .....	67
4.3 Estudo ex-in vivo.....	68
Crescimento e Viabilidade Celular.....	68
Análise por PCR em tempo real .....	71
Análise por Imunofluorescência.....	75
Atividade da Fosfatase Alcalina.....	78
Análise da formação de osso mineralizado semelhante a nódulos.....	79
4.4 Estudo in-vivo .....	82
Parâmetros histológicos (coloração HE) .....	82
Parâmetros imunoistoquímicos .....	84
Parâmetros microtomográficos (micro CT).....	93
Análise Biomecânica (torque reverso) .....	95
5. Discussão .....	105
6. Conclusão .....	111
7. Referências .....	113
8. ANEXOS.....	121
Anexo A – Aprovação do comitê de ética.....	121
Anexo B –Biomaterials .....	122
Link para as normas de publicação: .....	122
<a href="https://www.journals.elsevier.com/biomaterials">https://www.journals.elsevier.com/biomaterials</a> .....	122



# *Listas*



## *Lista de Figuras*

<b>Figura 1-</b> Sistema integrado para criação de faíscas elétricas (MAO) através da oxidação por plasma eletrolítico e incorporação pela técnica biomimética de íons cálcio e fosfato (Procedimento realizado na Faculdade de Engenharia – UNESP Sorocaba-SP). .....	35
<b>Figura 2</b> - Imagem ilustrativa demonstrando o ângulo de contato criado entre a água (L) com a superfície (AC / PEO) em relação ao ar (G). .....	37
<b>Figura 3</b> - Imagens demonstrativas do procedimento de ovariectomia: (A) Incisão da pele; (B) acesso ao plano interno; (C) divulsão da camada abdominal; (D) acesso a cavidade abdominal; (E) exposição do chifre uterino e tecido adiposo; (F) Laqueadura do chifre uterino; (G) ovário removido; (H) reintrodução do conteúdo abdominal para o interior da cavidade abdominal; (I) Sutura do plano muscular interno; (J) Sutura do plano externo. ....	39
<b>Figura 4</b> – Imagem passo a passo da extração da medula óssea do fêmur. ....	41
<b>Figura 5</b> – Imagem representativa do plaqueamento das células nos discos. ....	42
<b>Figura 6</b> - Imagem representativa após remoção das células dos discos para avaliação. ....	43
<b>Figura 7-</b> Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (A) Tricotomia, (B) antissepsia com PVPI; (C) Acesso cirúrgico à metáfise tibial; (D) e (E) Procedimento cirúrgico de preparação da tibia para instalação dos implantes e leito ósseo receptor do implante; (F) Instalação do implante com a chave digital; (G) Reposição dos tecidos incisados e sutura por planos; (H) Sutura em pele. ....	48
<b>Figura 8</b> - Demarcação da ROI no software CTAnalyzer. O quadro vermelho mostra uma aproximação para melhor visualização da área ao redor do implante correspondendo a região óssea mais crítica (medular). ....	51
<b>Figura 9</b> – Seleção da área de interesse (ROI). ....	51
<b>Figura 10</b> - Imagens fluorescentes obtidas por microscopia confocal a laser mostrando a precipitação de calceína - cor verde (A), vermelho de alizarina - cor vermelha (B) e a sobreposição de ambos os fluorocromos - calceína/alizarina (C), para a quantificação dos fluorocromos aos 14 e 42 dias após a instalação dos implantes. ....	54
<b>Figura 11</b> – Imagem representativa de lâminas coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel para análises histométricas: ELCOI e AON. (A) figura que representa o corte de tecidos calcificados da área de interesse a ser utilizado. (B e C) região periimplantar – área de interesse para análise (área negativa: implante; e osso em contato com o implante) mais central. (D) região de interesse (triângulo formado na interface do osso com o implante, da região correspondente a espira mais central, selecionada através do programa Image J e através da ferramenta de desenho livre “free hands”. (E) mensuração da área de osso neoformado, regiões coradas pelo vermelho de alizarina. ....	55
<b>Figura 12</b> - Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV) na magnitude de 300x da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO. ....	58
<b>Figura 13</b> - Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV) na magnitude de 2.000x da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO. ....	59
<b>Figura 14-</b> Quadro de dados representativos da Espectroscopia de Energia Dispersiva da superfície da liga Ti-6Al-4V texturizada por PEO. ....	59
<b>Figura 15</b> - Imagem representativa do mapeamento dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO pela técnica de EDS. ....	60
<b>Figura 16</b> -Mapa de cores mostrando a distribuição dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da Oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO) pela técnica de EDS. ....	61

<b>Figura 17</b> - Mapa de cores mostrando a distribuição dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da oxidação por plasma eletrolítico (PEO) pela técnica de EDS.....	62
<b>Figura 18</b> - Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV)/EDS nas magnitudes de 50x, 300x, 2.000x e 10.000x dos discos da liga Ti-6Al-4V com a superfície usinada (antes da texturização) e texturizadas por AC e PEO.....	63
<b>Figura 19</b> - Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV)/EDS nas magnitudes de 50x, 300x, 2.000x e 10.000x dos implantes de liga Ti-6Al-4V com a superfície usinada (antes da texturização) e texturizadas por AC e PEO, no período baseline. ....	64
<b>Figura 20</b> - Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV)/EDS nas magnitudes de 50x, 300x, e 2.000x e mapa de cores dos implantes de liga Ti-6Al-4V com as superfícies texturizadas por AC e PEO, no período de caracterização das superfícies (antes da remoção) e após o torque reverso (biomecânica: remoção dos implantes) .....	65
<b>Figura 21</b> - Energia de superfície e ângulo de contato com a água feito logo após o tratamento com PEO.....	66
<b>Figura 22</b> - Energia de superfície e ângulo de contato - Amostras Jateadas/ácido (AC), PEO e PEO após esterilização.....	66
<b>Figura 23</b> – Valores médios e desvio padrão representativos da rugosidade de superfície para os discos ácido/jateados (AC) e PEO: Ra (p = 0,701) / Rq (p = 0,929) / Rt (p = 0,555) / Rz (p = 0,614).....	67
<b>Figura 24</b> - Imagem gráfica da dosagem média de estógeno pelo método ELISA para os grupos SHAM, OVX e SENIL. ....	68
<b>Figura 25</b> – Viabilidade Celular para o Grupo SHAM. Período de 3 dias: Superfície CONTROLE 0,132+0,028; Superfície AC 0,107+0,016; Superfície PEO 0,102+0,012. Período de 7 dias: Superfície CONTROLE 0,157+0,022; Superfície AC 0,148+0,012; Superfície PEO 0,119+0,009. Período de 10 dias: Superfície CONTROLE 0,159+0,010; Superfície AC 0,168+0,001; Superfície PEO 0,135+0,017.....	69
<b>Figura 26</b> – Imagem gráfica - Viabilidade Celular para o Grupo SHAM. Período de 3 dias: Superfície CONTROLE 0,132+0,028; Superfície AC 0,107+0,016; Superfície PEO 0,102+0,012. Período de 7 dias: Superfície CONTROLE 0,157+0,022; Superfície AC 0,148+0,012; Superfície PEO 0,119+0,009. Período de 10 dias: Superfície CONTROLE 0,159+0,010; Superfície AC 0,168+0,001; Superfície PEO 0,135+0,017. ....	70
<b>Figura 27</b> – Imagem gráfica - Viabilidade Celular para o Grupo SENIL. Período de 3 dias: Superfície CONTROLE 0,149+0,018; Superfície AC 0,117+0,008; Superfície PEO 0,083+0,005. Período de 7 dias: Superfície CONTROLE 0,139+0,006; Superfície AC 0,146+0,008; Superfície PEO 0,097+0,013. Período de 10 dias: Superfície CONTROLE 0,171+0,004; Superfície AC 0,177+0,017; Superfície PEO 0,131+0,010. ....	71
<b>Figura 28</b> – Expressão gênica por PCR em Tempo Real para o Grupo SHAM.....	72
<b>Figura 29</b> – Imagem gráfica –Expressão Gênica por PCR em Tempo Real para o Grupo OVX. ....	73
<b>Figura 30</b> – Imagem gráfica –Expressão Gênica por PCR em Tempo Real para o Grupo SENIL.....	74
<b>Figura 31</b> – <b>Grupo SHAM:</b> Expressão da proteína OPN como grânulos no citoesqueleto e núcleo celular (A, C e D); Expressão da proteína BSP predominante no citoesqueleto celular (B), nenhuma expressão da BSP (D) e pouca expressão no núcleo (F). ....	75
<b>Figura 32</b> - <b>Grupo OVX:</b> Expressão da proteína OPN como grânulos no citoesqueleto e núcleo celular (A); Pouca expressão de OPN (C) e nenhuma expressão detectada (E);	



Expressão da proteína BSP predominante no citoesqueleto celular e no núcleo (B,D e F). .....	76
<b>Figura 33 - Grupo SENIL:</b> Expressão das proteínas OPN e BSP no citoesqueleto e núcleo celular (A e B); pouca expressão das proteínas OPN e BSP (C e D); nenhuma expressão das proteínas (E e F). .....	77
<b>Figura 34 –</b> Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP) no período de 10 dias para os grupos SHAM, OVX e SENIL. ....	79
<b>Figura 35 –</b> Gráfico da formação de nódulos de mineralização Grupo SHAM. Discos dos grupos Controle, AC e PEO com formação de nódulos de mineralização coradas com Vermelho de Alizarina.....	80
<b>Figura 36 –</b> Gráfico da formação de nódulos de mineralização Grupo OVX. Discos dos grupos Controle, AC e PEO com formação de nódulos de mineralização coradas com Vermelho de Alizarina.....	80
<b>Figura 37 –</b> Gráfico da formação de nódulos de mineralização Grupo SENIL. Discos dos grupos Controle, AC e PEO com formação de nódulos de mineralização coradas com Vermelho de Alizarina.....	81
<b>Figura 38 –</b> Discos sem células cultivadas dos Grupos Controle, AC e PEO coradas com Vermelho de Alizarina para avaliação do grau de retenção do corante. ....	81
<b>Figura 39 -</b> Fotomicrografia dos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL) em função dos métodos de texturização dos implantes (AC e PEO) na análise histológica pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) nos aumentos de 12x e 40x.....	83
<b>Figura 40 -</b> Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcção positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo SHAM AC: 1 (marcação leve); Grupo SHAM PEO: 1 (marcação leve). Grupo SHAM AC: 1 (marcação leve); Grupo SHAM PEO: 1 (marcação leve). (Aumentos originais 12x e 40x). *marcações: setas em vermelho.....	84
<b>Figura 41 -</b> Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcção positiva para proteína RANKL. Grupo SHAM AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo SHAM PEO: 2 (marcação moderada). Aumentos originais 12x e 40x. * marcações: setas em vermelho. ....	85
<b>Figura 42 -</b> Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcção positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo SHAM AC: 1 (marcação leve); Grupo SHAM PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho. ....	85
<b>Figura 43 -</b> Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcção positiva para proteína TRAP. Grupo SHAM AC: 1-2 (marcação de leve à moderada); Grupo SHAM PEO: 2 (marcação moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.....	86
<b>Figura 44 -</b> Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcção positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo OVX AC: 0-1 (marcação ausente à leve); Grupo OVX PEO: 2 (marcação moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho. ....	87
<b>Figura 45 -</b> Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcção positiva para proteína RANKL. Grupo OVX AC: 1 (marcação leve); Grupo OVX PEO: 0-1 (marcação ausente à leve). Aumentos originais 12x e 40x. *marcações: setas em vermelho. ....	87

<b>Figura 46</b> - Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo OVX AC: 0-1 (marcação ausente à leve); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho. ....	88
<b>Figura 47</b> - Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína TRAP. Grupo OVX AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve a moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *marcações: setas em vermelho.....	88
<b>Figura 48-</b> Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo SENIL AC: 1 (marcação leve); Grupo SENIL PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho. ....	89
<b>Figura 49</b> -Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína RANKL. Grupo SENIL AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo SENIL PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho. ....	90
<b>Figura 50-</b> Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo SENIL AC: 1 (marcação leve); Grupo SENIL PEO: 1 (marcação leve). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho. ....	90
<b>Figura 51</b> - Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína TRAP. Grupo SENIL AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo SENIL PEO: 1 (marcação leve). Aumentos originais 12x e 40x. *marcações: setas em vermelho. ....	91
<b>Figura 52</b> – Imagem representativa da reconstrução obtida pela microtomografia. (A) Reconstrução; (B) Corte medial do implante; (C) Seleção da região de interesse (ROI); (D) Implante com área de osso neoformado após seleção do ROI; (E e F) Área de osso neoformado analisado.....	93
<b>Figura 53</b> - Resultados gráficos dos parâmetros microtomográficos: Bv.Tv (porcentagem do volume ósseo) e Po(tot) (porcentagem da porosidade total). ....	94
<b>Figura 54</b> - Resultados gráficos dos parâmetros microtomográficos. (a)Tb.Th; (b)Tb.Sp; (c) Tb.N .....	95
<b>Figura 55</b> - Análise de Torque reverso: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (N.cm) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).....	96
<b>Figura 56</b> - Imagem da microscopia confocal à laser dos grupos experimentais.....	97
<b>Figura 57</b> – Área de Fluorocromos - Calceína: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel <sup>2</sup> ) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). ....	98
<b>Figura 58</b> - Área de Fluorocromos - Alizarina: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel <sup>2</sup> ) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). ....	99
<b>Figura 59</b> - Análise de Fluorocromos: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel <sup>2</sup> ) na comparação de Calceína vs Alizarina nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). ....	100
<b>Figura 60</b> – Taxa de aposição mineral (MAR – mineral apposition rate): Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel/dia) nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). ....	101
<b>Figura 61</b> – Imagens dos grupos experimentais para análise histométrica. ....	103

**Figura 62** – (A) - Análise da extensão linear de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (ELCOI) nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).  
(B) análise da área de osso neoformado (AON) na espira mais central de cada lado do implante nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). ..... 104

## *Lista de Abreviaturas*

<b>AC=</b>	Texturização por Duplo Ataque Ácido e jateamento
<b>ALP =</b>	Fosfatase alcalina
<b>AON =</b>	Área de osso neoformado
<b><math>\alpha</math>-MEM =</b>	Meio essencial mínimo
<b>BSP=</b>	Sialoproteína óssea
<b>BV/TV =</b>	Percentual de volume ósseo
<b>CTM-MO=</b>	Células tronco mesenquimais de medula óssea
<b>CA=</b>	Fosfato de Cálcio
<b>EDS=</b>	Espectroscopia de energia dispersiva
<b>ELCOI=</b>	Extensão linear de contato ósseo com a superfície do implante
<b>HE=</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>MAR=</b>	Mineral apposition rate – taxa de aposição mineral
<b>MEV=</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>MTS=</b>	Meio total suplementado
<b>OC=</b>	Osteocalcina
<b>OPG =</b>	Osteoprotegerina
<b>OPN =</b>	Osteopontina
<b>OVX=</b>	Ratas ovariectomizadas
<b>P=</b>	Fósforo
<b>PEO =</b>	Texturização por Oxidação por Plasma eletrolítico
<b>Po.Tot =</b>	Total porosity
<b>ROI =</b>	Região de interesse
<b>RANKL =</b>	Receptor ativador do fator nuclear K beta ligante
<b>RUNX2 =</b>	Runt-related transcription factor 2

<b>SHAM=</b>	Ratas submetidas à cirurgia ficcional não ovariectomizadas
<b>SP7 OU OSX =</b>	Fator de transcrição 7 ou Osterix
<b>Tb.Th =</b>	Trabecular thickness – espessura do trabéculo ósseo
<b>Tb.Sp =</b>	Trabecular space – separação das trabéculas ósseas
<b>Tb.N =</b>	Trabecular number – número de trabéculas ósseas
<b>Ti=</b>	Titânio
<b>Ticp=</b>	Titânio comercialmente puro
<b>Ti-6Al-4V=</b>	Liga Titânio – Alumínio - Vanádio
<b>TRAP =</b>	Fosfatase resistente ao tartarato



# *Introdução*

---

---

## 1. Introdução

Desde o surgimento da utilização do Titânio (Ti) na confecção dos implantes médico-odontológicos e dos princípios da osseointegração, surgem constantemente publicações na literatura para a investigação deste material. A pesquisa na indústria biomédica vem atuando continuamente na busca da melhoria das propriedades estruturais e biológicas das texturizações de superfícies dos implantes. Com objetivos de aumentar a resistência mecânica, resistência a corrosão e favorecer as respostas biológicas da osseointegração, pela maior área de superfície de contato, atraindo de forma eficaz e mais rapidamente células da linhagem osteoblástica, em especial em regiões de menor densidade de tecido ósseo [1, 2].

Tendo em vista a grande variedade de estudos na área de desenvolvimento de técnicas para realizar modificações topográficas e físico-químicas da superfície dos implantes dentários, podemos destacar as técnicas de adição e as técnicas de subtração [3-7].

As técnicas de adição possuem um grande destaque ao promover uma superfície do implante com saliências, sendo recobertas por plasma spray de titânio - TPS e de hidroxiapatita - HA, recobrimentos com HA e outros fosfatos de cálcio e deposição de íons [8, 9]. As técnicas de subtração por meio da criação de poros e pits na superfície do implante, como o eletropolimento, polimento mecânico, tratamentos com ácidos, associados ou não ao jateamento com óxido de titânio –  $TiO_2$  ou óxido de alumínio –  $Al_2O_3$ , oxidação e irradiação com laser [8, 10-12].

Há comprovação científica de resultados superiores do reparo ósseo nos implantes de superfície rugosa quando comparado com superfícies usinadas, sendo está bem documentada na literatura [1, 12-14]. O aumento da migração, proliferação celular, melhores retenções do coágulo sanguíneo devido ao aumento da área de contato da superfície do implante influenciam na melhor e mais rápida osteogênese [6, 12, 14].

Algumas ligas de titânio e texturizações são empregadas no mercado médico e odontológico sem apresentar antes da comercialização, no mínimo, estudos *in vitro* ou *in vivo* para a investigação das propriedades do material. Isso porque a literatura tem mostrado que alguns desses métodos alteram a resistência mecânica, o comportamento eletroquímico e as repostas reparacionais do titânio [2, 5, 15-17]. Reunir características favoráveis tanto nos aspectos microestruturais como nos aspectos biológicos

reparacionais, vem causando uma preocupação diante desta gama de opções de texturização [18-20].

A incorporação por meio da técnica de texturização por adição de cálcio, fósforo ou hidroxiapatita, elementos que são precipitados na matriz do tecido ósseo, através da anodização e o tratamento biomimético [21, 22], são técnicas as quais tem demonstrado maior afinidade com as células fundamentais de formação de osso [12, 14, 23]. A Oxidação por plasma eletrolítico (PEO) ou também denominado como deposição por faísca anódica, apresenta-se recentemente como um novo método para a texturização superficial dos implantes, ainda na fase de testes *in vitro* [24, 25].

Sendo um fator importante para a osseointegração, a criação de um revestimento como alta força adesiva aos substratos, este processo eletroquímico consiste na oxidação acompanhada por microdescargas na superfície do Ti ou suas ligas imersos em um eletrólito, mostrando uma superioridade mecânica, térmica, além das propriedades corrosivas e tricolorrosivas, [25-27]. Sendo assim, a oxidação eletrolítica é uma técnica promissora com passos simples e com métodos químicos bem controlados para a produção de microporos bioativos na superfície dos implantes. [28-30].

Marques et al. (2015) publicaram dois estudos que avaliaram a PEO para a produção de texturização na superfície do TiCP com a incorporação de cálcio, fósforo, prata e sílica, com diferentes concentrações destes elementos para estabelecer as melhores propriedades estruturais e de biocompatibilidade. As superfícies com as maiores concentrações de Ca e P mostraram a formação de uma estrutura cristalina mais homogênea, além de poros largos (aparência semelhante a vulcão, comprovado pela Microscopia de Força Atômica). Além disso, a PEO com incorporação de Ca/P promoveu propriedades antibacterianas nos testes microbiológicos e melhor proliferação de células tronco mesenquimais nos testes de cultura de células. Diante destes resultados, os autores encorajam novos estudos para a avaliação deste processo de texturização para possibilitar o seu emprego no mercado dos implantes dentários [29, 30].

O processo de remodelação contínua do tecido ósseo se faz necessário para manter a integridade estrutural e para desempenhar suas funções de suporte e homeostase mineral de forma saudável. Este processo de remodelação ocorre em unidades multicelulares básicas como osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, em um processo dinâmico de reabsorção, formação e mineralização óssea. A qualidade do tecido ósseo é um fator



essencial para que ocorra o fenômeno da osseointegração, no qual o complexo implante/tecido ósseo perimplantar será submetido à constantes oscilações térmicas, químicas e mecânicas ao longo da vida em um processo de remodelação acoplada [31, 32].

Quando ocorre algum fator que altere o balanceamento do catabolismo e anabolismo, ocorre uma perda da qualidade do tecido ósseo resultando no desenvolvimento de uma condição patológica, comprometendo a taxa de sucesso dos implantes osseointegráveis [33, 34].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu a osteoporose como “uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa óssea e deterioração na microarquitetura do tecido ósseo, com consequente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura” (OMS, 1993). Esta alteração sistêmica que causa diminuição expressiva da densidade óssea, não está posicionada como uma contraindicação no tratamento reabilitador de acordo com a literatura, porém, reduzem a taxa de sobrevivência dos implantes [33-35]. Esta desordem do metabolismo ósseo é classicamente reconhecida como um problema de saúde significativo em mulheres, pela depleção no fornecimento de estrógeno na fase pós-menopausa [36-38].

A necessidade de realização de novos estudos que busquem uma otimização do processo de reparo ósseo contínuo no complexo implante/tecido ósseo periimplantar em indivíduos que tendem a desenvolver uma condição sistêmica desfavorável, como a osteoporose é de suma importância, tendo em vista que a expectativa de vida e o acesso facilitado à tratamentos reabilitadores como implantes dentários estão em crescimento contínuo [39-41].

## **2. Objetivos**

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar um novo método de texturização por PEO com incorporação de Ca e P na superfície do Ti-6Al-4V em ossos de baixa densidade, por meio de avaliação *in vitro*, *ex-in vivo* e *in vivo*, em função de parâmetros topográficos e reparacionais.



# *Conclusão*

---

---

## 6. CONCLUSÃO

Diante das limitações do estudo *in vitro e in vivo*, os resultados foram esclarecedores para acreditar que o método de texturização aqui testado, por meio da Oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO), favoreceu à formação óssea, tanto em ossos de baixa densidade (OVX e SENIL) quanto em ossos considerados como “normais” (SHAM), inclusive evidenciando maior maturação óssea nos períodos mais tardios aqui analisados.



# *Referências*

---

---

## 7. REFERÊNCIAS

- [1] T. Albrektsson, A. Wennerberg, Oral implant surfaces: Part 1 - Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them, *Int J Prosthodont* 17(5) (2004) 536-543.
- [2] L.P. Faverani, V.A. Barao, M.F. Pires, J.C. Yuan, C. Sukotjo, M.T. Mathew, W.G. Assuncao, Corrosion kinetics and topography analysis of Ti-6Al-4V alloy subjected to different mouthwash solutions, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 43 (2014) 1-10.
- [3] D. Buser, N. Broggini, M. Wieland, R.K. Schenk, A.J. Denzer, D.L. Cochran, B. Hoffmann, A. Lussi, S.G. Steinemann, Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface, *Journal of dental research* 83(7) (2004) 529-33.
- [4] C.J. Ivanoff, C. Hallgren, G. Widmark, L. Sennerby, A. Wennerberg, Histologic evaluation of the bone integration of TiO<sub>2</sub> blasted and turned titanium microimplants in humans, *Clinical oral implants research* 12(2) (2001) 128-34.
- [5] M.G. Tavares, P.T. de Oliveira, A. Nanci, A.C. Hawthorne, A.L. Rosa, S.P. Xavier, Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhances contact osteogenesis, *Clinical oral implants research* 18(4) (2007) 452-8.
- [6] A. Wennerberg, T. Albrektsson, Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review, *Clinical oral implants research* 20 Suppl 4 (2009) 172-84.
- [7] S.P. Xavier, P.S. Carvalho, M.M. Beloti, A.L. Rosa, Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments, *Journal of dentistry* 31(3) (2003) 173-80.
- [8] A. Lin, C.J. Wang, J. Kelly, P. Gubbi, I. Nishimura, The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo, *The International journal of oral & maxillofacial implants* 24(5) (2009) 808-16.
- [9] A. Gupta, M. Dhanraj, G. Sivagami, Status of surface treatment in endosseous implant: a literary overview, *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research* 21(3) (2010) 433-8.
- [10] P. Trisi, R. Lazzara, A. Rebaudi, W. Rao, T. Testori, S.S. Porter, Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla, *Journal of periodontology* 74(7) (2003) 945-56.
- [11] N.T. Oliveira, F.P. Guastaldi, V. Perrotti, E. Hochuli-Vieira, A.C. Guastaldi, A. Piattelli, G. Iezzi, Biomedical Ti-Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits, *Clinical implant dentistry and related research* 15(3) (2013) 427-37.
- [12] T.P. Queiroz, F.A. Souza, A.C. Guastaldi, R. Margonar, I.R. Garcia, E. Hochuli-Vieira, Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits, *Clinical oral implants research* 24(8) (2013) 896-903.
- [13] W. Zechner, S. Tangl, G. Furst, G. Tepper, U. Thams, G. Mailath, G. Watzek, Osseous healing characteristics of three different implant types - A histologic and histomorphometric study in mini-pigs, *Clinical oral implants research* 14(2) (2003) 150-157.
- [14] F.A. Souza, T.P. Queiroz, A.C. Guastaldi, R. Garcia, O. Magro, R.S. Nishioka, K.E. Sisti, C.K. Sonoda, Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with

- surfaces modified by laser with and without silicate deposition: Biomechanical and scanning electron microscopy analysis, *J Biomed Mater Res B* 101B(1) (2013) 76-84.
- [15] R.L.W. Messer, G. Tackas, J. Mickalonis, Y. Brown, J.B. Lewis, J.C. Wataha, Corrosion of Machined Titanium Dental Implants Under Inflammatory Conditions, *J Biomed Mater Res B* 88B(2) (2009) 474-481.
- [16] L.P. Faverani, W.G. Assuncao, P.S. de Carvalho, J.C. Yuan, C. Sukotjo, M.T. Mathew, V.A. Barao, Effects of dextrose and lipopolysaccharide on the corrosion behavior of a Ti-6Al-4V alloy with a smooth surface or treated with double-acid-etching, *PloS one* 9(3) (2014) e93377.
- [17] V.A. Barao, A.P. Ricomini-Filho, L.P. Faverani, A.A. Del Bel Cury, C. Sukotjo, D.R. Monteiro, J.C. Yuan, M.T. Mathew, R.C. do Amaral, M.F. Mesquita, W.J. da Silva, W.G. Assuncao, The role of nicotine, cotinine and caffeine on the electrochemical behavior and bacterial colonization to cp-Ti, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 56 (2015) 114-24.
- [18] I.-J. Hwang, H.-C. Choe, W.A. Brantley, Electrochemical characteristics of Ti-6Al-4V after plasma electrolytic oxidation in solutions containing Ca, P, and Zn ions, *Surface and Coatings Technology* 320 (2017) 458-466.
- [19] A. Krzakała, K. Służalska, M. Widziółek, J. Szade, A. Winiarski, G. Dercz, A. Kazek, G. Tylko, J. Michalska, A. Iwaniak, A.M. Osyczka, W. Simka, Formation of bioactive coatings on a Ti-6Al-7Nb alloy by plasma electrolytic oxidation, *Electrochimica Acta* 104 (2013) 407-424.
- [20] S. Lederer, P. Lutz, W. Fürbeth, Surface modification of Ti 13Nb 13Zr by plasma electrolytic oxidation, *Surface and Coatings Technology* 335 (2018) 62-71.
- [21] C. Ferreira Ribeiro, K. Cogo-Muller, G.C. Franco, L.R. Silva-Concilio, M. Sampaio Campos, S. de Mello Rode, A.C. Claro Neves, Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study, *Archives of oral biology* 69 (2016) 33-39.
- [22] M.W.D. Mendes, C.G. Agreda, A.H.A. Bressiani, J.C. Bressiani, A new titanium based alloy Ti-27Nb-13Zr produced by powder metallurgy with biomimetic coating for use as a biomaterial, *Mat Sci Eng C-Mater* 63 (2016) 671-677.
- [23] W. Luo, J. Zhao, X. Meng, S. Ma, Q. Sun, T. Guo, Y. Wang, Y. Zhou, [Effect of Zinc Doped Calcium Phosphate Coating on Bone Formation and the Underlying Biological Mechanism], *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi* 32(6) (2015) 1359-63.
- [24] A.K.-K. A. Krzakala, and W. Simka, Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys, *RSC Adv* 3 (2013) 19725.
- [25] C.A. Laurindo, R.D. Torres, S.A. Mali, J.L. Gilbert, P. Soares, Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 37 (2014) 223-31.
- [26] X.N. A. L. Yerokhin, A. Leyland, A. Matthews, and S. J. Dowey, Plasma electrolysis for surface engineering, *Surface and Coatings Technology* 122(2-3) (1999) 73-93.
- [27] C.T.J.L. F. C. Walsh, R. J. K. Wood, K. T. Stevens, J. Archer, A. R. Poeton, and A. Ryder, Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al, Mg, Ti) alloys, *Transactions of the IMF: The International Journal of Surface Engineering and Coatings* 87(3) (2009) 122-35.
- [28] T. Akatsu, Y. Yamada, Y. Hoshikawa, T. Onoki, Y. Shinoda, F. Wakai, Multifunctional porous titanium oxide coating with apatite forming ability and photocatalytic activity on a titanium substrate formed by plasma electrolytic oxidation, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 33(8) (2013) 4871-5.

- [29] d.C.N. Marques Ida S, Landers R, Yuan JC, Mesquita MF, Sukotjo C, Mathew MT, Barão VA., Incorporation of Ca, P, and Si on bioactive coatings produced by plasma electrolytic oxidation: The role of electrolyte concentration and treatment duration, *Biointerphases* 10(4) (2015) 041002.
- [30] I.D. Marques, V.A. Barao, N.C. da Cruz, J.C. Yuan, M.F. Mesquita, A.P. Ricomini-Filho, C. Sukotjo, M.T. Mathew, Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application, 100 (2015) 133-146.
- [31] U.H. Lerner, Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis, *Journal of dental research* 85(7) (2006) 584-95.
- [32] U.H. Lerner, Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis, *Journal of dental research* 85(7) (2006) 596-607.
- [33] D. Hurst, Evidence unclear on whether Type I or II diabetes increases the risk of implant failure, *Evidence-based dentistry* 15(4) (2014) 102-3.
- [34] J. He, B. Zhao, C. Deng, D. Shang, C. Zhang, Assessment of implant cumulative survival rates in sites with different bone density and related prognostic factors: an 8-year retrospective study of 2,684 implants, *The International journal of oral & maxillofacial implants* 30(2) (2015) 360-71.
- [35] B.R. Chrcanovic, T. Albrektsson, A. Wennerberg, Diabetes and oral implant failure: a systematic review, *Journal of dental research* 93(9) (2014) 859-67.
- [36] D. LeRoith, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Pediatric endocrinology. Foreword*, *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 41(4) (2012) xi-xiii.
- [37] R. Rapaport, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Pediatric endocrinology. Preface*, *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 41(4) (2012) xv-xvi.
- [38] D. LeRoith, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Neuroendocrine control of metabolism. Foreword*, *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 42(1) (2013) xi-xiii.
- [39] E.A. Aguilar, S.D. Barry, C.A. Cefalu, A. Abdo, W.P. Hudson, J.S. Campbell, T.M. Reske, M. Bonafede, K. Wilson, B.S. Stolshek, C.J. Paoli, N. Tran, L.I. Cheng, *Osteoporosis Diagnosis and Management in Long-Term Care Facility*, *The American journal of the medical sciences* 350(5) (2015) 357-63.
- [40] H. Lehnert, [Underestimated osteoporosis: New directions in diagnosis and therapy], *Deutsche medizinische Wochenschrift* 140(22) (2015) 1660.
- [41] B. Zhou, Y. Lu, K. Hajifathalian, J. Bentham, M. Di Cesare, G. Danaei, H. Bixby, M.J. Cowan, M.K. Ali, C. Taddei, W.C. Lo, B. Reis-Santos, G.A. Stevens, L.M. Riley, J.J. Miranda, P. Bjerregaard, J.A. Rivera, H.M. Fouad, G.S. Ma, J.C.N. Mbanya, S.T. McGarvey, V. Mohan, A. Onat, A. Ramachandran, H. Ben Romdhane, C.J. Paciorek, J.E. Bennett, M. Ezzati, Z.A. Abdeen, K.A. Kadir, N.M. Abu-Rmeileh, B. Acosta-Cazares, R. Adams, W. Aekplakorn, C.A. Aguilar-Salinas, C. Agyemang, A. Ahmadvand, A.R. Al-Othman, A. Alkerwi, P. Amouyel, A. Amuzu, L.B. Andersen, S.A. Anderssen, R.M. Anjana, H. Aounallah-Skhiri, T. Aris, N. Arlappa, D. Arveiler, F.K. Assah, M. Avdicova, F. Azizi, N. Balakrishna, P. Bandosz, C.M. Barbagallo, A. Barcelo, A.M. Batiha, L.A. Baur, H. Ben Romdhane, M. Benet, A. Bernabe-Ortiz, S. Bharadwaj, S.K. Bhargava, Y.F. Bi, P. Bjerregaard, E. Bjertness, M.B. Bjertness, C. Bjorkelund, A. Blokstra, S. Bo, B.O. Boehm, C.P. Boissonnet, P. Bovet, I. Brajkovich, J. Breckenkamp, H. Brenner, L.M. Brewster, G.R. Brian, G. Bruno, A. Bugge, A.C. de Leon, G. Can, A.P.C. Candido, V. Capuano, A.C. Carlsson, M.J. Carvalho, F.F. Casanueva, J.P. Casas, C.A. Caserta, K. Castetbon, S. Chamukuttan, N. Chaturvedi, C.J. Chen, F.F. Chen, S.H. Chen, C.Y. Cheng,

A. Chetrit, S.T. Chiou, Y. Cho, J. Chudek, R. Cifkova, F. Claessens, H. Concin, C. Cooper, R. Cooper, S. Costanzo, D. Cotel, C. Cowell, A.B. Crujeiras, G. D'Arrigo, J. Dallongeville, R. Dankner, L. Dauchet, G. de Gaetano, S. De Henauw, M. Deepa, A. Dehghan, V. Deschamps, K. Dhana, A.F. Di Castelnuovo, S. Djalalinia, K. Doua, W. Drygas, Y. Du, V. Dzerve, E.E. Egbagbe, R. Eggertsen, J. El Ati, R. Elosua, R.T. Erasmus, C. Erem, G. Ergor, L. Eriksen, J. Escobedo-de la Pena, C.H. Fall, F. Farzadfar, F.J. Felix-Redondo, T.S. Ferguson, D. Fernandez-Berges, M. Ferrari, C. Ferreccio, E.J.M. Feskens, J.D. Finn, B. Foger, L.H. Foo, A.S. Forslund, H.M. Fouad, D.K. Francis, M.D. Franco, O.H. Franco, G. Frontera, T. Furusawa, Z. Gaciong, S.P. Garnett, J.M. Gaspoz, M. Gasull, L. Gates, J.M. Geleijnse, A. Ghasemian, A. Ghimire, S. Giampaoli, F. Gianfagna, J. Giovannelli, A. Giwerzman, M.G. Gross, J.P.G. Rivas, M.B. Gorbea, F. Gottrand, D. Grafnetter, T. Grodzicki, A. Grontved, G. Gruden, D.F. Gu, O.P. Guan, R. Guerrero, I. Guessous, A.L. Guimaraes, L. Gutierrez, I.R. Hambleton, R. Hardy, R.H. Kumar, J. Hata, C. Heidemann, S. Herrala, I.T. Hihtaniemi, S.Y. Ho, S.C. Ho, A. Hofman, C.M. Hormiga, B.L. Horta, L. Houti, C. Howitt, T.T. Htay, A.S. Htet, M.M.T. Htike, M.M.T. Htike, Y. Hu, A.S. Hussieni, I. Huybrechts, N. Hwalla, L. Iacoviello, A.G. Iannone, M.M. Ibrahim, N. Ikeda, M.A. Ikram, V.E. Irazola, M. Islam, M. Iwasaki, J.M. Jacobs, T. Jafar, K.M. Jamil, G. Jasienska, C.Q. Jiang, J.B. Jonas, P. Joshi, A. Kafatos, O. Kalter-Leibovici, A. Kasaeian, J. Katz, P. Kaur, M. Kavousi, R. Kelishadi, A.P. Kengne, M. Kersting, Y.S. Khader, D. Khalili, Y.H. Khang, S. Kiechl, J. Kim, P. Kolsteren, W. Kratzer, D. Kromhout, U.M. Kujala, K. Kula, C. Kyobutungi, T. Laatikainen, C. Lachat, Y. Laid, T.H. Lam, O. Landrove, V. Lanska, G. Lappas, A. Laxmaiah, C. Leclercq, J. Lee, J. Lee, T. Lehtimaki, R. Lekhraj, L.M. Leon-Munoz, Y.P. Li, W.Y. Lim, M.F. Lima-Costa, H.H. Lin, X. Lin, L. Lissner, R. Lorbeer, J.E. Lozano, D. Luksiene, A. Lundqvist, P. Lytsy, G.S. Ma, G.L.L. Machado-Coelho, S. Machi, S. Maggi, D.J. Magliano, M. Makdisse, K.M. Rao, Y. Manios, E. Manzato, P. Margozzini, P. Marques-Vidal, R. Martorell, S.R. Masoodi, E.B. Mathiesen, T.E. Matsha, J.C.N. Mbanya, S.R. McFarlane, S.T. McGarvey, S. McLachlan, B.A. McNulty, S. Mediene-Benchechor, A. Meirhaeghe, A.M.B. Menezes, S. Merat, I.I. Meshram, J. Mi, J.F. Miquel, J.J. Miranda, M.K. Mohamed, K. Mohammad, N. Mohammadifard, V. Mohan, M.F.M. Yusoff, N.C. Moller, D. Molnar, C.K. Mondo, A. Morejon, L.A. Moreno, K. Morgan, G. Moschonis, M. Mossakowska, A. Mostafa, J. Mota, J. Motta, T.T. Mu, M.L. Muiesan, M. Muller-Nurasyid, J. Mursu, G. Nagel, J. Namesna, E.E.K. Nang, V.B. Nangia, E.M. Navarrete-Munoz, N.C. Ndiaye, I. Nenko, F. Nervi, N.D. Nguyen, Q.N. Nguyen, R.S.E. Nieto-Martinez, G. Ning, T. Ninomiya, M. Noale, D. Noto, M. Al Nsour, A.M. Ochoa-Aviles, K. Oh, A. Onat, P. Ordunez, C. Osmond, J.A. Otero, E. Owusu-Dabo, E. Pahomova, L. Palmieri, S. Panda-Jonas, F. Panza, M. Parsaeian, S.V. Peixoto, M. Peltonen, A. Peters, N. Peykari, S.T. Pham, A. Pilav, F. Pitakaka, A. Piwonska, J. Piwonski, P. Plans-Rubio, M. Porta, M.L.P. Portegies, H. Poustchi, R. Pradeepa, J.F. Price, M. Punab, R.F. Qasrawi, M. Qorbani, R. Radisauskas, M. Rahman, O. Raitakari, S.R. Rao, A. Ramachandran, J. Ramke, R. Ramos, S. Rampal, W. Rathmann, J. Redon, P.F.M. Reganit, F. Rigo, S.M. Robinson, C. Robitaille, F. Rodriguez-Artalejo, M.D. Rodriguez-Perez, L.A. Rodriguez-Villamizar, R. Rojas-Martinez, K. Ronkainen, A. Rosengren, A. Rubinstein, O. Rui, B.S. Ruiz-Betancourt, A.R.V.R. Horimoto, M. Rutkowski, C. Sabanayagam, H.S. Sachdev, O. Saidi, S. Sakarya, B. Salanave, J.T. Salonen, M. Salvetti, J. Sanchez-Abanto, D. Santos, R.N. dos Santos, R. Santos, J.L. Saramies, L.B. Sardinha, N. Sarrafzadegan, K.U. Saum, M. Sczufca, H. Schargrodsky, C. Scheidt-Nave, A.A. Sein, S.K. Sharma, J.E. Shaw, K. Shibuya, Y. Shin, R. Shiri, R. Siantar, A.M. Sibai, M. Simon, J. Simons, L.A. Simons, M. Sjostrom, J. Slowikowska-Hilczer, P. Slusarczyk, L. Smeeth, M.B. Snijder, H.K. So, E. Sobngwi, S. Soderberg, V.



Solfrizzi, E. Sonestedt, A. Soumare, J.A. Staessen, M.G. Stathopoulou, J. Steene-Johannessen, P. Stehle, A.D. Stein, J. Stessman, D. Stockl, J. Stokwiszewski, K. Stronks, M.W. Strufaldi, C.A. Sun, J. Sundstrom, Y.T. Sung, P. Suriyawongpaisal, R.G. Sy, E.S. Tai, A. Tamosiunas, L. Tang, M. Tarawneh, C.B. Tarqui-Mamani, A. Taylor, H. Theobald, L. Thijs, B.H. Thuesen, H.K. Tolonen, J.S. Tolstrup, M. Topbas, M. Torrent, P. Traissac, O.T.H. Trinh, M.K. Tulloch-Reid, T.P. Tuomainen, M.L. Turley, C. Tzourio, P. Ueda, F.A.M. Ukoli, H. Ulmer, H.M.T. Uusitalo, G. Valdivia, D. Valvi, L. van Rossem, I.G.M. van Valkengoed, D. Vanderschueren, D. Vanuzzo, T. Vega, G. Velasquez-Melendez, G. Veronesi, W.M.M. Verschuren, R. Verstraeten, L. Viet, J. Vioque, J.K. Virtanen, B. Viswanathan, P. Vollenweider, S. Voutilainen, M. Vrijheid, A.N. Wade, A. Wagner, J. Walton, W.N.W. Mohamud, F. Wang, M.D. Wang, Q. Wang, Y.X. Wang, S.G. Wannamethee, D. Weerasekera, P.H. Whincup, K. Widhalm, A.H. Wijga, R.J. Wilks, J. Willeit, T. Wilsgaard, B. Wojtyniak, T.Y. Wong, J. Woo, M. Woodward, F.C. Wu, S.L. Wu, H.Q. Xu, W.L. Yan, X.G. Yang, X.W. Ye, A. Yoshihara, N.O. Younger-Coleman, S. Zambon, A.H. Zargar, T. Zdrojewski, W.H. Zhao, Y.F. Zheng, J.Z. Cisneros, N.R.F. Collaboration, Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants, *Lancet* 387(10027) (2016) 1513-1530.

[42] L. Lara Rodriguez, P.A. Sundaram, E. Rosim-Fachini, A.M. Padovani, N. Difffoot-Carlo, Plasma electrolytic oxidation coatings on gammaTiAl alloy for potential biomedical applications, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 102(5) (2014) 988-1001.

[43] E.C. Combe, B.A. Owen, J.S. Hodges, A protocol for determining the surface free energy of dental materials, *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 20(3) (2004) 262-8.

[44] L.P. Faverani, V.A. Barao, G. Ramalho-Ferreira, M.B. Ferreira, I.R. Garcia-Junior, W.G. Assuncao, Effect of bleaching agents and soft drink on titanium surface topography, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 102(1) (2014) 22-30.

[45] E.R. Luvizuto, S.M. Dias, T.P. Queiroz, T. Okamoto, I.R. Garcia, R. Okamoto, R.C. Dornelles, Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene, *Bone* 46(4) (2010) 1021-9.

[46] E.R. Luvizuto, T.P. Queiroz, S.M. Dias, T. Okamoto, R.C. Dornelles, I.R. Garcia, R. Okamoto, Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene, *Arch Oral Biol* 55(1) (2010) 52-9.

[47] R.P. Abuna, F.S. De Oliveira, S. Santos Tde, T.R. Guerra, A.L. Rosa, M.M. Beloti, Participation of TNF-alpha in Inhibitory Effects of Adipocytes on Osteoblast Differentiation, *Journal of cellular physiology* 231(1) (2016) 204-14.

[48] G.P. Freitas, H.B. Lopes, A.L.G. Almeida, R.P.F. Abuna, R. Gimenes, L.E.B. Souza, D.T. Covas, M.M. Beloti, A.L. Rosa, Potential of Osteoblastic Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue Associated with a Polymer/Ceramic Composite to Repair Bone Tissue, *Calcified tissue international* (2017).

[49] C. Maniopoulos, J. Sodek, A.H. Melcher, Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats, *Cell and tissue research* 254(2) (1988) 317-30.

[50] T.S. Santos, R.P. Abuna, L.M. Castro Raucci, L.N. Teixeira, P.T. de Oliveira, M.M. Beloti, A.L. Rosa, Mesenchymal Stem Cells Repress Osteoblast Differentiation Under Osteogenic-Inducing Conditions, *Journal of cellular biochemistry* 116(12) (2015) 2896-902.

- [51] E. Hamade, G. Azzar, J. Radisson, R. Buchet, B. Roux, Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro: Influence of Ca<sup>2+</sup> and nature of substrates, *European journal of biochemistry* 270(9) (2003) 2082-2090.
- [52] P.J. Marie, Transcription factors controlling osteoblastogenesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473(2) (2008) 98-105.
- [53] K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J.M. Deng, R.R. Behringer, B. de Crombrughe, The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation, *Cell* 108(1) (2002) 17-29.
- [54] L. Yang, P. Cheng, C. Chen, H.B. He, G.Q. Xie, H.D. Zhou, H. Xie, X.P. Wu, X.H. Luo, miR-93/Sp7 function loop mediates osteoblast mineralization, *J Bone Miner Res* 27(7) (2012) 1598-606.
- [55] P.T. de Oliveira, A. Nanci, Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells, *Biomaterials* 25(3) (2004) 403-13.
- [56] P.T. de Oliveira, S.F. Zalzal, M.M. Beloti, A.L. Rosa, A. Nanci, Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography, *Journal of biomedical materials research. Part A* 80(3) (2007) 554-64.
- [57] D. Krupa, J. Baszkiewicz, J. Zdunek, J.W. Sobczak, W. Lisowski, J. Smolik, Z. Slomka, Effect of plasma electrolytic oxidation in the solutions containing Ca, P, Si, Na on the properties of titanium, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 100(8) (2012) 2156-66.
- [58] W.F. Pedrosa, Jr., R. Okamoto, P.E. Faria, M.F. Arnez, S.P. Xavier, L.A. Salata, Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone, *Clinical oral implants research* 20(11) (2009) 1254-64.
- [59] N. Manrique, C.C. Pereira, E.R. Luvizuto, P. Sanchez Mdel, T. Okamoto, R. Okamoto, D.H. Sumida, C. Antoniali, Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats, *Clin Oral Investig* 19(6) (2015) 1319-27.
- [60] L.P. Faverani, T.O.B. Polo, G. Ramalho-Ferreira, G.A.C. Momesso, J.S. Hassumi, A.C. Rossi, A.R. Freire, F.B. Prado, E.R. Luvizuto, R. Gruber, R. Okamoto, Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats, *Clinical Oral Investigations* (2017).
- [61] E.S. Ogawa, A.O. Matos, T. Beline, I.S. Marques, C. Sukotjo, M.T. Mathew, E.C. Rangel, N.C. Cruz, M.F. Mesquita, R.X. Consani, V.A. Barao, Surface-treated commercially pure titanium for biomedical applications: Electrochemical, structural, mechanical and chemical characterizations, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 65 (2016) 251-61.
- [62] I. Marques, M.F. Alfaro, N.C.D. Cruz, M.F. Mesquita, C. Takoudis, C. Sukotjo, M.T. Mathew, V.A.R. Barao, Tribocorrosion behavior of biofunctional titanium oxide films produced by micro-arc oxidation: Synergism and mechanisms, *J Mech Behav Biomed Mater* 60 (2016) 8-21.
- [63] A.O. Matos, A.P. Ricomini-Filho, T. Beline, E.S. Ogawa, B.E. Costa-Oliveira, A.B. de Almeida, F.H. Nociti Junior, E.C. Rangel, N.C. da Cruz, C. Sukotjo, M.T. Mathew, V.A.R. Barao, Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface, *Colloids Surf B Biointerfaces* 152 (2017) 354-366.
- [64] J.M. Cordeiro, T. Beline, A.L.R. Ribeiro, E.C. Rangel, N.C. da Cruz, R. Landers, L.P. Faverani, L.G. Vaz, L.M.G. Fais, F.B. Vicente, C.R. Grandini, M.T. Mathew, C. Sukotjo, V.A.R. Barao, Development of binary and ternary titanium alloys for dental implants, *Dent Mater* 33(11) (2017) 1244-1257.

- [65] E.G. Alves, R. Serakides, J.N. Boeloni, I.R. Rosado, N.M. Ocarino, H.P. Oliveira, A.M. Góes, C.M. Rezende, Comparative study of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue of adult dogs, *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36 (2016) 21-32.
- [66] D.-J. Chung, K. Hayashi, C.A. Toupadakis, A. Wong, C.E. Yellowley, Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia, *Research in veterinary science* 92(1) (2012) 66-75.
- [67] A. Kazek-Kesik, K. Kuna, W. Dec, M. Widziolek, G. Tylko, A.M. Osyczka, W. Simka, In vitro bioactivity investigations of Ti-15Mo alloy after electrochemical surface modification, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 104(5) (2016) 903-13.
- [68] T. He, C. Cao, Z. Xu, G. Li, H. Cao, X. Liu, C. Zhang, Y. Dong, A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model, *Scientific reports* 7(1) (2017) 16270.
- [69] J. He, W. Feng, B.H. Zhao, W. Zhang, Z. Lin, In Vivo Effect of Titanium Implants with Porous Zinc-Containing Coatings Prepared by Plasma Electrolytic Oxidation Method on Osseointegration in Rabbits, *The International journal of oral & maxillofacial implants* 33(2) (2018) 298-310.
- [70] X. Lu, M. Mohedano, C. Blawert, E. Matykina, R. Arrabal, K.U. Kainer, M.L. Zheludkevich, Plasma electrolytic oxidation coatings with particle additions – A review, *Surface and Coatings Technology* 307 (2016) 1165-1182.
- [71] T.S. Zaporozhets, A.V. Puz', S.L. Sinebryukhov, S.V. Gnedenkov, T.P. Smolina, N.N. Besednova, Biocompatibility of Modified Osteoinductive Calcium-Phosphate Coatings of Metal Implants, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 162(3) (2017) 366-369.
- [72] G. Ramalho-Ferreira, L.P. Faverani, F.B. Prado, I.R. Garcia, Jr., R. Okamoto, Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 44(6) (2015) 798-805.
- [73] L.P. Faverani, T.O. Polo, G. Ramalho-Ferreira, G.A. Momesso, J.S. Hassumi, A.C. Rossi, A.R. Freire, F.B. Prado, E.R. Luvizuto, R. Gruber, R. Okamoto, Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats, *Clin Oral Investig* (2017).